

METHOD FOR AMPLIFICATION OF TARGET RNA MOLECULE

Patent number: JP7059599
Publication date: 1995-03-07
Inventor: DEBITSUDO EICHI GERUFUANDO; TOOMASU
DABURIYU MAIYAAZU; KURISUTOFUAA ERU
SHIGIYUA
Applicant: HOFFMANN LA ROCHE
Classification:
- **international:** C12Q1/68; C12N15/09
- **european:** C12N9/12B7B7; C12Q1/68D2; C12Q1/68D2A;
C12Q1/68D4
Application number: JP19940184220 19940701
Priority number(s): US19930086483 19930701

Also published as:

EP0632134 (A)
EP0632134 (A)
EP0632134 (B)

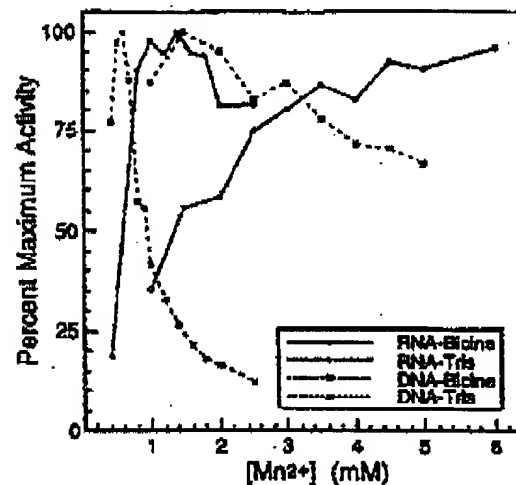
Report a data error he

Abstract not available for JP7059599

Abstract of corresponding document: EP0632134

Methods are provided for the replication and amplification of RNA sequences by thermoactive DNA polymerases. The reverse transcription reaction is performed in an appropriate buffer comprising a metal buffer which buffers the divalent cation concentration and which buffer preferably buffers both the pH and the divalent cation concentration. Said divalent cation is preferably Mn^{2+} . In a preferred embodiment, high temperature reverse transcription is coupled to nucleic acid amplification in a one tube, one enzyme procedure using a thermostable DNA polymerase. Methods for eliminating carry over contamination of amplifications due to prior reverse transcription reactions are also provided. Reagents and kits particularly suited for the methods of the present invention are provided.

FIG 1



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-59599

(43) 公開日 平成7年(1995)3月7日

(51) Int. Cl.	識別記号	F I
C12Q 1/68	A 9453-48	
C12N 15/09	ZNA	
	9050-4B	C12N 15/00
		ZNA A

審査請求 未請求 請求項の数27 書面 (全37頁)

(21) 出願番号 特願平6-184220

(22) 出願日 平成6年(1994)7月1日

(31) 優先権主張番号 086483

(32) 優先日 1993年7月1日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591003013

エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCH
E AKTIENGESELLSCHAFT

スイス・シーエイチ-4002バーゼル・グレ
ンツアーヘルストラツセ124

(72) 発明者 デビッド エイチ. ゲルフアンド
アメリカ合衆国カリフォルニア州オークラ
ンド, チェルトン ドライブ 6208

(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

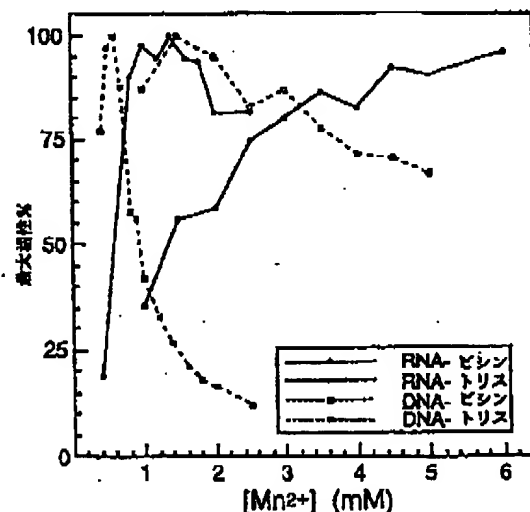
(54) 【発明の名称】 標的RNA分子の増幅方法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、熱活性ポリメラーゼを使用するRNA配列の転写および増幅の改良された方法、それに使用する試薬および試薬キットを提供することを目的とする。

【構成】 本発明の方法において、逆転写反応は2価陽イオン濃度、好ましくはpHおよび2価陽イオン濃度の両者を緩衝する金属緩衝剤を含有する緩衝溶液中にて行われる。2価陽イオンは、好ましくは Mn^{2+} イオンである。本発明において高温逆転写反応は、熱安定性DNAポリメラーゼを使用する1チューブ、1酵素法の核酸増幅反応と結合される。

【効果】 増幅反応に適用して先行する逆転写反応および増幅反応等の生成物の持ち越しによる夾雑を取り除いて高感度、高特異性を有する逆転写/増幅反応の卵となる。



(2)

特開平7-59599

2.

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の標的RNA分子の増幅方法であつて、

(a) 前記試料を、4種すべてのデオキシリボヌクレオシド三リン酸の存在下、2価陽イオンを含む適切な緩衝溶液中の、第1および第2のプライマーならびに熱安定性DNAポリメラーゼを含む反応混合物中において、前記熱安定性DNAポリメラーゼが前記第1のプライマーの伸長生成物の合成を開始して前記標的RNAに相補的なcDNA分子を与えるために充分な温度にて処理し、
ここに於いて前記第1のプライマーは、前記標的RNAに対して、それにハイブリダイズして前記標的RNAに相補的なcDNA分子の合成を開始するに充分に相補的であり、前記第2のプライマーは、前記cDNAにハイブリダイズし伸長生成物の合成を開始するに充分に前記標的RNAに対し相補的であり；

(b) 前記反応混合物を、単鎖cDNAを与えるために適切な温度にて処理し；

(c) 前記反応混合物を、前記熱安定性DNAポリメラーゼが前記第2のプライマーの伸長生成物の合成を開始して二重鎖cDNA分子を与えるために適切な温度にて処理し；および

(d) 工程(c)の二重鎖cDNAをポリメラーゼ連鎖反応により増幅する、工程を含んでなり、前記工程

(a)および(d)の緩衝溶液が前記2価陽イオンを結合する緩衝剤を更に含有し、前記2価陽イオンが好ましくは Mn^{2+} であり、前記緩衝剤の20℃かつ0.1Mのイオン強度における2価陽イオン結合反応の K_M が、 1.0×10^4 および 1.0^5 の間、好ましくは 1.0^3 および 1.0^4 の間、より好ましくは 1.0^2 および 1.0^3 の間であることを特徴とする試料中の標的RNA分子の増幅方法。

【請求項2】 前記緩衝剤が水素イオン緩衝作用を与える両性イオン性化合物であり、前記緩衝溶液の20℃かつ0.1Mのイオン強度における pK_a が7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記緩衝溶液が、更にN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンまたはN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンを含んでなる請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記緩衝溶液が、更に酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウムおよび酢酸リチウムからなる群から選択される酢酸塩を含んでなる請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記熱安定性DNAポリメラーゼが、*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼまたは*Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼである請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 前記DNAポリメラーゼが、組換えTth DNAポリメラーゼである請求項5に記載の方法。

【請求項7】 工程(a)の温度が、40℃および80℃の間である請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 慣用および非慣用のヌクレオシド三リン酸を逆転写反応混合物に混合し、該慣用および非慣用のヌクレオチドが取り込まれたcDNAを生成させた結果として、先行する逆転写反応により生成する核酸で夾雑する逆転写反応物、逆転写/増幅反応物または増幅反応物の滅菌方法であつて、該方法は前記非慣用ヌクレオチドの共有結合を加水分解することにより夾雑核酸を分解することを含んでなり、前記逆転写反応混合物は更に*Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼ、2価陽イオン、好ましくは Mn^{2+} および緩衝溶液を含み、前記緩衝溶液は前記2価陽イオンと結合する緩衝剤を含み、前記緩衝溶液の20℃、かつ0.1Mのイオン強度における前記2価陽イオン結合反応の K_M が、 1.0×10^4 および 1.0^5 の間、好ましくは 1.0^3 および 1.0^4 の間、より好ましくは 1.0^2 および 1.0^3 の間である反応物の滅菌方法。

【請求項9】 前記先行する逆転写反応物が均質逆転写/増幅反応物である請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記緩衝剤が水素イオン緩衝作用を与える両性イオン性化合物であり、前記緩衝溶液の20℃かつ0.1Mのイオン強度における pK_a が7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間である請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】 前記緩衝溶液が、更にN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンまたはN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンを含んでなる請求項8または9に記載の方法。

【請求項12】 前記緩衝溶液が、更に酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウムおよび酢酸リチウムからなる群から選択される酢酸塩を含んでなる請求項11に記載の方法。

【請求項13】 均質逆転写/増幅反応進行のための緩衝溶液であつて、2価陽イオン、1価陽イオンおよび緩衝剤を含有し、該2価陽イオンが好ましくは Mn^{2+} であり、該緩衝剤が前記2価陽イオンと結合するキレート化剤であり、前記緩衝溶液の20℃、かつ0.1Mのイオン強度における前記2価陽イオン結合反応の K_M が、 1.0×10^4 および 1.0^5 の間、好ましくは 1.0^3 および 1.0^4 の間、より好ましくは 1.0^2 および 1.0^3 の間であることを特徴とする緩衝溶液。

【請求項14】 前記緩衝剤が水素イオン緩衝作用を与える両性イオン性化合物であり、前記緩衝溶液の20℃かつ0.1Mのイオン強度における pK_a が7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間である請求項13に記載の緩衝溶液。

(3)

特開平7-59599

3

4

【請求項15】前記緩衝剤が、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンまたはN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンである請求項13に記載の緩衝剤。

【請求項16】前記2価陽イオンが、酢酸マンガ、塩化マンガまたは硫酸マンガにより供給され、前記1価陽イオンが酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウムまたは酢酸リチウムからなる群から選択される酢酸塩により供給される請求項15に記載の緩衝溶液。

【請求項17】前記2価陽イオンが1.2および6mMの間の濃度をもって、酢酸マンガにより供給される請求項16に記載の緩衝溶液。

【請求項18】該1価陽イオンが酢酸カリウムにより供給される請求項16に記載の緩衝溶液。

【請求項19】試料中の標的RNA分子の逆転写方法であって：前記試料を、前記標的RNAに対してそれにハイブリダイズして前記標的RNAに相補的なcDNA分子の合成を開始するに充分に相補的なプライマー、熱活性DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、および2価陽イオン、好ましくは Mn^{2+} を含む適切な緩衝溶液を含んでなる反応混合物中で、前記熱安定性DNAポリメラーゼが前記プライマーの伸長生成物の合成を開始して前記標的RNAに相補的なcDNA分子を与えるために充分な温度にて処理する工程を工程を含み：前記緩衝溶液が前記2価陽イオンを結合する緩衝剤を更に含有し、前記緩衝剤の20℃かつ0.1Mのイオン強度における2価陽イオン結合反応の K_d が、10および 10^6 の間、好ましくは 10^2 および 10^4 の間、より好ましくは 10^3 および 10^5 の間であることを特徴とする試料中の標的RNA分子の逆転写方法。

【請求項20】前記緩衝剤が水素イオン緩衝作用を与える両性イオン性化合物であり、前記緩衝溶液の20℃かつ0.1Mのイオン強度におけるpKaが7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間である請求項19に記載の方法。

【請求項21】前記緩衝溶液が、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンまたはN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンを更に含有する請求項19に記載の方法。

【請求項22】前記緩衝溶液が、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンまたはN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンを更に含有し、かつ前記緩衝溶液が、更に酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウムおよび酢酸リチウムからなる群から選択される酢酸塩を含んでなる請求項20に記載の方法。

【請求項23】前記熱活性DNAポリメラーゼが、*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼまたは*Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼである請求項22に記載の方法。

【請求項24】前記DNAポリメラーゼが、組換えTth DNAポリメラーゼである請求項23に記載の方法。

【請求項25】前記反応混合物の前記温度が40℃および80℃の間である請求項23または24に記載の方法。

【請求項26】熱安定性DNAポリメラーゼを使用する逆転写反応逆行のための請求項13～18に記載の緩衝溶液の使用。

【請求項27】請求項13～18に記載の緩衝溶液および熱安定性DNAポリメラーゼを含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、分子生物学の分野に関し、特使リボ核酸(RNA)配列の複写および増幅のために有用な方法および試薬を提供するものである。別な面において、本発明は、先行する逆転写反応にて生じた核酸により夾雑する逆転写反応物、均質逆転写/増幅反応物または増幅反応物の滅菌方法を提供する。更に別の面では、本発明は試料中の標的RNAの逆転写方法を提供する。

【0002】関連技術の記述および本発明において使用される用語に説明については、項温度逆転写方法を提供する関連出願、すなわち国際特許出願公開WO91/09944が参考となる。

【0003】本発明に関連して、Taqポリメラーゼは、2価金属イオンとして Mg^{2+} を使用してcDNAを非効率的に合成することが報告されている(JonesおよびFoulkes, 1989, Nuc. Acid. Res. 176:8387-8388)。TseおよびForget, 1990, Gene 88:293-296;およびShaffer等, 1990, Anal. Biochem. 190:292-296は、Taqポリメラーゼおよび Mg^{2+} イオンを使用するRNAの増幅方法を記述している。しかしながら、この方法は、非効率的でかつ低感度である。例えば、TseおよびForgetは、豊富に発現されたmRNA標的を使用して、エチジウムブロマイド染色ゲル可視化のために充分なPCR生成物を生じさせるために全RNAを4μg必要とすることを示した。加うるに、DNAテンプレート(先行する反応由来、またはプラスミドDNA夾雑物由来のPCR生成物)からの擬陽性シグナルは、厳密には除去されなかった。

【0004】本発明は、この要求に向けられるもので、熱活性DNAポリメラーゼによる高温cDNA合成のための改良された方法および試薬、特に改良された緩衝溶液系を提供するものである。本発明の試薬は、熱安定性DNAポリメラーゼを使用する1酵素、1チューブの結合逆転写/増幅アッセイのために特に好適である。

【0005】一側面において、本発明は試料中の標的RNA分子の増幅方法であって：

50

(4)

特開平7-59599

5

(a) 前記試料を、4種すべてのデオキシリボヌクレオシド三リン酸の存在下、2価陽イオンを含む適切な緩衝溶液中の、第1および第2のプライマーならびに熱安定性DNAポリメラーゼを含む反応混合物中において、前記熱安定性DNAポリメラーゼが前記第1のプライマーの伸長生成物の合成を開始して前記標的RNAに相補的なcDNA分子を与えるために充分な温度にて処理し、ここにおいて前記第1のプライマーは、前記標的RNAに対して、それにハイブリダイズして前記標的RNAに相補的なcDNA分子の合成を開始するに充分に相補的であり、前記第2のプライマーは、前記cDNAにハイブリダイズし伸長生成物の合成を開始するに充分に前記標的RNAに対し相補的であり；

(b) 前記反応混合物を、単鎖cDNAを与えるために適切な温度にて処理し；

(c) 前記反応混合物を、前記熱安定性DNAポリメラーゼが前記第2のプライマーの伸長生成物の合成を開始して二重鎖cDNA分子を与えるために適切な温度にて処理し；および

(d) 工程(c)の二重鎖cDNAをポリメラーゼ連鎖反応により増幅する、工程を含む増幅方法を提供する。前記工程(a)および(d)の前記適切な緩衝液は、前記2価陽イオンを結合する緩衝剤を更に含有し、前記2価陽イオンは好ましくは Mn^{2+} であり、前記緩衝剤の20℃かつ0.1Mのイオン強度における2価陽イオン結合反応の K_M は、 1.0 および 1.0^5 の間、好ましくは 1.0^3 および 1.0^4 の間、より好ましくは $1.0^{3.5}$ および $1.0^{4.5}$ の間である。前記緩衝剤は、好ましくは水素イオン緩衝作用を与える両性イオン性化合物であり、前記緩衝液の20℃かつ0.1Mのイオン強度における pK_a は、7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間である。好ましい実施態様において、前記緩衝液は、更にN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンまたはN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンを含んでなり、更に好ましくは、前記緩衝液は、更に酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウムおよび酢酸リチウムからなる群から選択される酢酸塩を含んでなる。最も好ましい実施態様において、緩衝液は酢酸マンガン($Mn(OAc)$)、または $Mn(CH_3CO_2)$ 、とも記される)、ピシン-KOH(ピシンはN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシンである)および酢酸カリウム($KOAc$ または KCH_3CO_2 とも記される)を含んでなる。前記熱安定性DNAポリメラーゼは、好ましくは*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼまたは*Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼ、最も好ましくは組換えTth DNAポリメラーゼである。好ましい実施態様において、工程(a)の温度は、40℃および80℃の間である。

【0006】本発明は、先行する逆転写、増幅、および

6

／または均質逆転写／増幅反応から生じる核酸により夾雑する逆転写反応物、増幅反応物、および均質逆転写／増幅反応物の滅菌方法をも提供するものである。例えば、本発明は、慣用および非慣用のヌクレオシド三リン酸を逆転写反応混合物に混合し、該慣用および非慣用のヌクレオチドが取り込まれたcDNAを生成させた結果として、先行する逆転写反応により生成する核酸で夾雑する逆転写反応物の滅菌方法であって、前記非慣用ヌクレオチドの共有結合を加水分解することにより夾雑核酸を分解することを含んでなる方法を提供する。

【0007】別の面において、本発明は、慣用および非慣用のヌクレオシド三リン酸を均質逆転写／増幅反応混合物に混合し、該慣用および非慣用のヌクレオチドが取り込まれたcDNAを生成させた結果として、先行する均質逆転写／増幅反応により生成する核酸で夾雑する逆転写反応物の滅菌方法であって、前記非慣用ヌクレオチドの共有結合を加水分解することにより夾雑増幅生成物を分解することを含んでなる方法を提供する。

【0008】一実施態様においてこの方法は、標的核酸配列を含む水溶液中で、夾雑核酸生成物をウラシル-DNAグリコシラーゼにより分解することを含んでなり；更に、該グリコシラーゼを標的核酸配列の存在下で不活性化し(例えば加熱による)；ならびに標的配列を熱安定性DNAポリメラーゼにより逆転写および増幅することを含んでなる。該夾雑生成物の分解は、該生成物が、核酸逆転写／増幅反応系に接触する間に行われうる。従って、逆転写／増幅用試料を調製し、該試料を本発明方法により処理して先行する逆転写、増幅、および／または均質逆転写／増幅反応により生じた夾雑核酸を分解し、次いで工程間で反応体積または組成を調節する必要なしに試料中の標的核酸を増幅することができる。

【0009】別の側面において、本発明は、マンガンイオン濃度を緩衝する金属緩衝液、および好ましい実施態様においてpHおよびマンガンイオン濃度の両者を緩衝する金属緩衝液を含んでなる試薬を提供する。該緩衝液は、本発明の方法における使用可能なマンガンおよびdNTP濃度範囲を有意に拡大し、これをもってアッセイの強健性を増大し、かつ試料調製において導入されるマンガンキレート剤による問題を低減する。該緩衝液は、本発明の滅菌方法におけるより高いdUTP濃度の使用を可能とし、このことはある種の標的におけるdUTP取り込みを増強し、また該2価金属イオン濃度を低減し、反応混合物のイオン強度を低下させることによって滅菌の効率を増大させる。該緩衝液は、 Mn^{2+} 触媒RNA加水分解をも低減し、このことは希少なおよび／またはより長い標的の逆転写のためにより長い逆転写時間を可能とする。更に、本発明の緩衝液および試薬(例えばdNTP)は、緩衝された濃度許容性のために調製することが容易であり、また改良された保存および安定性の特性を与える。而して本発明は、均質逆

(5)

特開平7-59599

8

転写/増幅反応遂行のための緩衝溶液であって、2価陽イオン、1価陽イオンおよび緩衝剤を含有し、該2価陽イオンが好ましくは Mn^{2+} であり、該緩衝剤が前記2価陽イオンと結合するキレート化剤であり、前記緩衝溶液の20℃、かつ0.1Mのイオン強度における前記2価陽イオン結合反応の K_M が、10および 10^5 の間、好ましくは 10^2 および 10^4 の間、より好ましくは $10^{2.5}$ および $10^{3.5}$ の間であることを特徴とする緩衝溶液を提供する。好ましい緩衝溶液において、前記緩衝剤は水素イオン緩衝作用を与える両性化合物であり、ここにおいて前記緩衝溶液の20℃かつ0.1Mのイオン強度における pK_a は、7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間である。本発明の好ましい実施態様において、該緩衝溶液は、酢酸マンガ、ピシン-KOHおよび酢酸カリウムを含む。本発明は、試料中の標的RNA分子の逆転写方法であって：前記試料を、前記標的RNAに対してそれにハイブリダイズして前記標的RNAに相補的なcDNA分子の合成を開始するに十分に相補的なプライマー、熱活性DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、および Mn^{2+} を含む適切な緩衝溶液を含んでなる反応混合物中で、前記熱安定性DNAポリメラーゼが前記プライマーの伸長生成物の合成を開始して前記標的RNAに相補的なcDNA分子を与えるために十分な温度にて処理する工程を工程を含み：前記緩衝溶液が前記 Mn^{2+} と結合する緩衝剤を更に含有し、前記緩衝剤の20℃かつ0.1Mのイオン強度における2価陽イオン結合反応の K_M が、10および 10^5 の間、好ましくは 10^2 および 10^4 の間、より好ましくは $10^{2.5}$ および $10^{3.5}$ の間であることを特徴とする試料中の標的RNA分子の逆転写方法を提供するものである。

【0010】本発明の背景の詳細な記述については、ここに参考として取り入れるWO91/09944を引用する。

【0011】以下の図面は、本発明を理解するために役立つであろう。図1は、例7に記述される伸長反応の結果を表すものであって、異なる緩衝溶液条件を使用するマンガンの濃度の範囲に亘って反応効率をアッセイしたものである。

【0012】図2は、例9に記述されるRT/PCRの結果を示すものであって、dNTP濃度の使用可能な範囲について、異なる緩衝溶液条件を使用してアッセイしたものである。

【0013】本発明は、RNAの効率的な逆転写および増幅のための改良された方法に関する。従って、例えば該方法は、逆転写および増幅工程の間で、反応成分を修飾するために反応容器を開く必要が除かれる結合1チューブ処理法に対して提供される。このようにして、先行する反応に由来する逆転写または増幅生成物によるRNA逆転写/増幅アッセイの持ち越し夾雑物の影響が最小

になる。

【0014】本発明の方法は、RNAテンプレートに該RNAテンプレートにハイブリダイズするために十分に相補的なプライマーおよび熱活性DNAポリメラーゼと共に含む試料を、4種すべてのデオキシリボヌクレオシド三リン酸の存在下、マンガニオン濃度、および好ましい実施態様においてはpHとマンガニオン濃度との両者を緩衝する金属緩衝剤を含む適切な緩衝溶液中で処理することを含んでなり、該反応は、前記プライマーが前記RNAテンプレートにハイブリダイズし、かつ、前記熱活性DNAポリメラーゼが前記デオキシリボヌクレオシド三リン酸のポリマー化反応に触媒作用して、前記DNAテンプレートの配列に相補的なcDNA配列を形成するために十分な温度にて遂行される。本発明によれば、DNAポリメラーゼは、熱活性であると共に熱安定性であり得る。

【0015】別の面において、RNAテンプレートにアニール化するに好適なプライマーは、PCRによる増幅のためにも適しているであろう。PCRのためには、逆転写されたcDNAに相補的な第2のプライマーが伸長生成物のための部位を与える。

【0016】熱活性DNAポリメラーゼによるRNA分子の増幅において、第1の伸長反応はRNAテンプレートを使用する逆転写反応であり、DNA鎖が生成される。該DNAテンプレートを使用する第2の伸長反応は、二重鎖DNA分子を生成する。従って、RNAテンプレートからの熱活性DNAポリメラーゼによる相補的なDNA鎖の合成は、増幅のための出発物質を与える。

【0017】熱安定性DNAポリメラーゼは、結合された1酵素逆転写/増幅反応において、使用されうる。該方法は、非均質および均質RT/PCRアッセイの両者に対して提供される。ここにおいて使用される「均質」なる用語は、RNA標的の逆転写および増幅のための2工程1添加反応を指す。均質とは、逆転写工程に続いて反応容器を開放する必要、または増幅工程の前に反応成分を調節する必要がないことを意味する。非均質RT/PCR反応においては、逆転写に続いて増幅反応の前に、酵素、プライマー、2価陽イオン、塩類、pHまたはdNTPを含むいずれかの反応成分が調節され、添加され、あるいは希釈される。

【0018】「均質逆転写/増幅反応混合物」なる用語は、標的RNAを逆転写および増幅するために使用される種々の試薬を含む水溶液を指す。これらは、酵素、水性緩衝剤、塩類、オリゴヌクレオチドプライマー類、標的核酸およびヌクレオシド三リン酸を含む。状況に依存して、該混合物は完全または不完全な均質逆転写/増幅反応混合物のいずれかであり得る。

【0019】本発明は、試料中のRNA標的分子検出のための単純化され、改良された方法にも関連する。これらの方法は、逆転写、第2のcDNA鎖合成、および所

(6)

特開平7-59599

9

10

望により増幅について触媒作用する熱安定性DNAポリメラーゼを採用する。先行技術の方法は、各工程について異なる酵素を使用するために必要となる2組のインキュベーション条件を必要とした。本発明の方法は、従来のRNAクローニングおよび診断方法よりも少ない工程による、有意に増強された特異性を持ったRNA転写および増幅法を提供する。これらの方法は、研究室あるいは臨床分析のためのキットにおける使用に適用可能である。

【0020】「逆転写反応混合物」なる用語は、標的RNAの逆転写のために使用される種々の試薬を含む水溶液を指す。これらは、酵素、水性緩衝剤、塩類、オリゴヌクレオチドプライマー、標的核酸、およびヌクレオシド三リン酸を含む。状況に依存して、該混合物は完全または不完全逆転写反応混合物のいずれであってもよい。

【0021】cDNA生成物の増幅のためには、多くの方法が当業者に利用可能である。ここにおいて使用されるように、「増幅反応系」なる用語は核酸の標的配列の複写物を増幅するためのいずれかのインビトロ手段を指す。そのような方法は、限定されるものではないが、ポリメラーゼ (PCR)、DNAリガーゼ (LCR)、 α β RNAレプリカーゼおよびRNA転写 (TASおよび3SR) に基づく増幅系を含む。しかしながら、ここで記述される均質RT/PCR法は、3SR等の多工程、多酵素増幅法に対して、1種のポリメラーゼ酵素のみを使用するという重要な優位点を有している。

【0022】実際に、いくつかの異なる核酸に基づく増幅系は、2価金属イオン (例えば Mn^{2+}) 最適条件のかなりの拡大、ならびにRNAテンプレート-支配合成およびDNAテンプレート-支配合成についての明かに異なる二重の最適条件の驚くべき拡大によって利益を得る。これらすべての系は、1サイクルまたは反応の1部により合成される生成物が、引き続きサイクルまたは反応の引き続き部分のテンプレートとして働くことにおいて、PCR工程に基づく。リガーゼ連鎖反応 (ここを参考として取り入れるLCR, WuおよびWallence, 1989, Genomics 4:560-669およびBarany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193) においては、DNAの所望の分節をDNAリガーゼを用いて Mg^{2+} および必要な共因子の存在下で増幅するために、4種のオリゴヌクレオチドが使用される。厳密なアニール化温度および熱活性かつ熱耐性DNAリガーゼの使用は、この工程の感度および対立遺伝子変位の差異の識別能力を有的に改良する。天然の好熱性DNAリガーゼ (例えば、ここを参考として取り入れるTakahashi, YamaguchiおよびUchida, 1984, J. Biol. Chem. 259:10041-10047) あるいは、組換え親熱性DNAリガーゼ (例えばここを参考として取り入れるBaran

yおよびGelfand, 1991, Gene 109:1-11) のいずれを使用するにしても、本発明の緩衝液および緩衝剤は、金属イオン最適条件を拡大し、RNAテンプレート-支配リグレーションおよびDNAテンプレート-支配リグレーションの両者を促進し、2価金属イオンの存在下、上昇温度下でのRNAテンプレートの安定性を向上するために有用である。

【0023】同様に2種以上の酵素を使用するPCRおよびLCRから誘導される核酸増幅工程 (ここに参考として取り入れる、ポリメラーゼ・リガーゼ連鎖反応, Barany, 1991, PCR Methods and Applic. 1:5-16;またはGap-LCR, PCT特許公開WO90/01069;またはリパー連鎖反応, ヨーロッパ特許公開EP-A-439, 182) は、RNAテンプレート-支配合成およびDNAテンプレート-支配合成の両者に対しての2価金属イオン最適条件の拡大、ならびに2価金属イオンの存在下での上昇温度におけるRNAテンプレートの安定性の増加のために本発明の緩衝液および緩衝剤から利益を得るであろう。このことは、工程内で使用され、異なる核酸と相互作用する酵素が、通常異なる2価金属イオン最適条件を有する場合に特に有利である。

【0024】同様に複数の酵素を使用する等温核酸増幅工程 (ここに参考として取り入れる3SR, Kwokら, 1989, Proc. Natl. Sci. USA 86:1173-1177, Guatelliら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, PCT特許公開WO92/0880A;NASBA, 米国特許5, 130, 238) は、RNAテンプレート-支配合成およびDNAテンプレート-支配合成の両者に対しての2価金属イオン最適条件の拡大から利益を得るであろう。このことは、工程内で使用され、異なる核酸と相互作用する酵素が、通常異なる2価金属イオン最適条件を有する場合に特に有利である。上述の等温増幅系は、いずれも中温性または非熱活性および熱感受性核酸結合酵素を使用する。類似する熱活性かつ熱耐性酵素に基づく等温増幅系 (例えば、[1] *Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼによるAMVまたはMoMuLV逆転写酵素の置換、[2] *Thermus thermophilus* RNase [ItayaおよびKondo, 1991, Nuc. Acids Res. 19:4443-4449] による*E. coli* RNase Hの置換、ならびに[3] *Thermus thermophilus* ファージ ϕ YS40 [SasakiおよびOshima, 1975, J. Virol. 15:1449-1453] RNAポリメラーゼによるバクテリオファージT3、T7またはSP6 RNAポリメラーゼの置換) は、上述の理由に加えて、2価金属イオンの存在下での上昇温度におけるRNAテンプレートの安定性の

(7)

特開平7-59599

11

増加および本発明の緩衝溶液および緩衝剤から利益を得るであろう。

【0025】本発明は、特定の増幅系に限定されるものではない。他の系が開発されれば、それらは本発明を実施することにより利益を得るであろう。増幅系に関する最近の調査は、ここに参考として取り入れるAbramsonおよびMyers, 1993, *Current Opinion in Biotechnology* 4:41-47にて刊行されている。

【0026】「増幅反応混合物」なる用語は、標的核酸の増幅のために使用される種々の試薬を含む水溶液を指す。これらは、酵素、水性緩衝剤、塩類、増幅プライマー、標的核酸、およびヌクレオシド三リン酸を含む。状況に依存して、該混合物は完全または増幅反応混合物のいずれであってもよい。本発明の好ましい実施態様において、増幅系はPCRであり、増幅反応混合物はPCR混合物である。

【0027】「緩衝溶液」なる用語は、緩衝剤または緩衝剤混合物、および場合により2価陽イオンおよび1価陽イオンを含む溶液を指す。

【0028】本発明は、多くの供給源に由来するRNAを逆転写し、増幅するために好適である。RNAテンプレートは、ウイルスまたは細菌性核酸調製物等の微生物由来の核酸調製物中に含まれてよい。該調製物は、細胞残渣および他の成分、精製全RNA、または精製mRNAを含んでよい。該RNAテンプレートは、試料中の異種RNA分子の母集団または特定の標的RNA分子であってもよい。

【0029】この方法において使用するために好適なRNAは、特定の標的RNAを含むことが予想される生物学的試料中に含まれてよい。生物学的試料は、例えば血液試料または生検組織試料等のRNAが該試料の小部分である異種試料であってもよい。従って、この方法は、臨床検査および診断のために有用である。RNAは、特定の疾患または感染物質を示すものであり得る。

【0030】RNAは、WO91/09944に引用されているような種々の方法のいずれにより調製されてもよい。

【0031】合成オリゴヌクレオチドは、ここに参考として取り入れるMatteucciらの、1981, *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191のトリエステル法を使用して調製されうる。他の方法としては、例えばBiosearch 8700 DNA合成装置等によるシアノエチルホスホラミダイト化学を使用する自動合成が好ましい。

【0032】プライマー伸長を起こさせるためには、このプライマーがRNAテンプレートにアニールしなければならない。逆転写を起こすためには、プライマーのすべてのヌクレオチドがテンプレートにアニールする必要はない。プライマー配列は、テンプレートの正確な配列

12

を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片をプライマーの5'末端に連結し、プライマー配列の残る部分をRNAに相補的としてもよい。他の方法として、プライマー配列がRNAテンプレートとハイブリダイズするために十分に相補的であって、かつ相補DNA鎖の合成を可能とする限り、プライマー中に非相補的塩基を分散させてもよい。

【0033】cDNA調製の従来方法においては、プレアニール化工程を必要とした。プライマーをRNAにハイブリダイズさせるために、RNAテンプレートの2次および3次構造の不安定化が必要とされるであろう。一般に、アニール化は種々の方法により実施され、アニール化緩衝溶液の存在下で定型的に行われる。Maniatisらの、1982, *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*, Cold Spring Harbor, New Yorkは、アニール化緩衝溶液の例を提供する。アニール化法は、限定されるものではないが、RNA/プライマー混合物を高温で短時間インキュベートし、次いで段階的に冷却するか、または該混合物をドライアイス/エタノール浴中で急速に凍結することを含む。逆転写のために従来使用されていた低温度において、鎖内2次構造相互作用がcDNA合成またはプライマーのアニール化と干渉することを防止するために、ある研究者はメチル水銀水酸化物等の化学変性剤にて処理することにより、RNAテンプレートを修飾している(BaileyおよびDavidson, 1976, *Anal. Biochem.* 70:75)。しかしながら、そのような変性剤は、一般に極めて毒性で発ガン性の化合物であって、酵素阻害を防止するためにも注意深く除去しなければならない。

【0034】プライマーは逆転写を起こすためにテンプレートにアニール化しなければならないが、別個のアニール化工程は必要ではない。熱活性逆転写酵素活性は、厳密なアニール化のために好ましい高温でも非可逆的変性を受けないため、ポリメラーゼ添加に先立って、変性テンプレートの急速冷凍または段階的冷却の必要差異がない。従来方法では、加熱され変性されたRNAは、酵素活性に適合した条件を与える温度、通常37-42℃まで低下させる間にアニール化したプライマー-テンプレート構造を維持するように冷却する必要があった。RNAの高温逆転写方法は、プレアニール化工程および化学変性剤の使用の必要性を除去した(例えば例1-4参照)。本発明は、RNAの2次および3次構造を不安定化する改良方法を提供する。熱安定性DNAポリメラーゼによる逆転写のための温度は、RNAの2次および3次構造を更に不安定化し、かつ二重鎖RNA標的の変性作用もする。

【0035】本発明は、アニール化プライマー-RNAテンプレートの逆転写が、熱活性かつ熱安定性DNAポ

(8)

特開平7-59599

13

リメラーゼにより触媒作用される方法を提供する。ここにおいて使用されるように、「熱安定性ポリメラーゼ」なる用語は、熱安定性または耐熱性であって、デオキシリボヌクレオチドのポリマー化に触媒作用して核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物を形成する酵素を指す。ここで有用な熱安定性DNAポリメラーゼは、PCR増幅に際して、単鎖核酸の不安定化または二重鎖核酸の変性に必要な時間、昇温下に付しても非可逆的に不活性化されることがない。非可逆的不活性化とは、酵素活性の実質的損失をいう。好ましくは熱安定性DNAポリメラーゼは、ポリマー化条件の約90~100℃にて非可逆的に変性されない。

【0036】本発明の別の面において、高温逆転写のためのDNAポリメラーゼが熱活性であることは不可欠なことである。ここにおいて使用されるように、「熱活性ポリメラーゼ」なる用語は、60℃以上の温度でデオキシリボヌクレオチドのポリマー化に効率的に触媒作用して核酸テンプレート鎖に相補的なプライマー伸長物を形成することができる酵素を指す。本発明によれば、逆転写のための熱活性DNAポリメラーゼは、50℃以上

で最大活性を有する。該熱活性DNAポリメラーゼは、RNA不安定化およびプライマーアニール化の条件下、60~80℃の温度で不可逆的に変性されない。

【0037】示される例において、熱活性DNAポリメラーゼは、熱安定性でもある：しかしながら、熱活性で非熱安定性酵素も、本発明の実施に好適である。RNAからのcDNAの調製は、上昇温度における反復する変性サイクルを含まないため、該方法で有用な酵素が熱活性であることに加えて熱安定性である必要はない。しかしながら本発明の一実施態様において、均質RT/PCR法が示される。RTおよびPCR工程の間で反応成分が調整されないで熱安定性DNAポリメラーゼが好ましい。

【0038】加熱条件は、緩衝溶液、塩濃度、および変性される核酸に依存するであろう。当然のことながら、mRNAの逆転写についてテンプレート分子は一般に単鎖であり、従って高温の変性工程が不要であることは認識されるであろう。しかしながら、二重鎖RNAも、最初の変性または鎖分離工程に続く逆転写/増幅方法のための好適なテンプレートを与える。本発明は、二重鎖RNAの熱変性に必要な高温においてRNAの分解を低減し、これによって二重鎖RNAテンプレートからの逆転写/増幅反応の効率を改善する緩衝溶液を提供する。本発明の緩衝溶液は、完全反応混合物の大雑把なかなり高温での処理が、RNAの2次および3次構造を逆転写反応のプライマーアニール化工程の直前に不安定化することを許容する(例12)。二重鎖RNAテンプレートは、例えばレオウイルス、ブルータングウイルス、コロラドチック熱ウイルス、および酵母殺因子等を含んでよい。

14

【0039】RNA不安定化の温度は、典型的には50~80℃の範囲である。プライマー伸長の第1のサイクルは、上述した変性および増幅に適した二重鎖テンプレートを与える。核酸変性の温度は、典型的には約90~100℃の範囲であり、変性が起こるに十分な時間は核酸長、塩基成分、試料中に存在する単鎖配列間の相補性に依存するが、典型的には約10秒から4分間である。

【0040】熱安定性または熱活性DNAポリメラーゼは、好ましくは約40℃以上、例えば60~80℃の温度で至適活性を有する。42℃よりかなりな高温では、熱安定性または熱活性DNAポリメラーゼ以外のDNAおよびRNA-依存ポリメラーゼは、不活性化する。ここに参考として取り入れるShimomaveおよびSalvato、1989、Gene Anal. Techn., 6:25-28は、AMV-RTは、42℃において最大活性を有することを記述している。50℃において該酵素は50%の活性を有し、55℃においてはAMV-RTは活性最大水準の僅かに10%を保持するにすぎない。従って、AMV-RTはRNAテンプレートを使用する高温ポリマー化反応を触媒するには不適当である。本願方法は、熱活性DNAポリメラーゼによる効率的な高温逆転写方法を提供する。

【0041】プライマーのテンプレートに対するハイブリッド化は、組成およびプライマーの長さに加えて塩濃度に依存する。熱安定性または熱活性ポリメラーゼを使用する場合には、ハイブリッド化は高温(例えば45~70℃)にて起こり得て、これは選択性の増大および/またはプライミングの高い厳密性のために好適である。ポリメラーゼ酵素について的高温の至適性は、プライマーハイブリッド化工程での選択性のためにRNA逆転写および引き続く増幅がより高い特異性を持って進むことを可能とする。好ましくはRNA逆転写の至適温度は、約55~75℃、更に好ましくは60~70℃の範囲である。

【0042】本発明は、熱安定性DNAポリメラーゼにより触媒作用を受ける向上したプライマー指向特異性をもったRNAテンプレートの逆転写方法を提供する。開示される方法は、RNAの逆転写の従来方法に対し、改良されている。これらの方法は、RNA/cDNAハイブリッド中間体分子を介してRNA断片の増幅を与える。該ハイブリッド分子は、PCRによる増幅のために好適なテンプレートである。従って逆転写および増幅反応が結合される。従来のRNA増幅法は、増幅反応開始に先行してRNA/プライマー混合物を逆転写酵素の存在下で37~42℃においてインキュベートすることを必要とした。本発明によれば、RNA増幅のためのすべての酵素的工程は、熱安定性DNAポリメラーゼによる触媒作用によって行われる。TaqおよびTth DNAポリメラーゼの商業的入手可能性、Tth DNAポリメラー

ゼ調製のための開示された方法、およびTthDNAポリメラーゼ逆転写/DNA増幅キット(Perkin Elmer, Norwalk, CT)の商業的入手可能性によって、PCRにもたらされる優位点は、ここに開示される方法によって、RNAの逆転写、RNA検出、cDNA調製および結合逆転写/cDNA増幅に対して適用可能である。

【0043】PCRによるDNA増幅方法は周知であり、ここに参考として取り入れる米国特許4,683,195、4,683,202および4,965,188号に記述されている。本発明により提供される優位点の理解を容易にするために、PCRの要約を示す。PCRは、増幅されるべき二重鎖標的核酸配列にハイブリッドする2種類のプライマーを必要とする。PCRにおいて、二重鎖標的配列は変性され、該変性標的の核酸に1個のプライマーがアニール化する。プライマーは標的核酸に、他方から離れた部位において、一方のプライマーの伸長生成物とその相補体から分離された場合に他方のプライマーとハイブリッド可能であるような配向をもってアニール化する。一旦プライマーが標的配列にハイブリッドすると、該プライマーはDNAポリメラーゼの作用により伸長される。次いで伸長生成物は、標的核酸から変性され、該工程が反復される。

【0044】この工程の引き続くサイクルにおいて、先のサイクルにおいて生成された伸長生成物は、DNA合成のテンプレートとして機能する。第2のサイクルから始めて、増幅生成物は指数的速度で蓄積され始める。増幅生成物は、個別の二重鎖DNA分子であり、場合により第2のプライマーに相補的な配列が統いた第1のプライマーの配列を含む第1の鎖、および第1の鎖に相補的な第2の鎖を含んでなる。

【0045】PCR法により可能な膨大な増幅によって、高いDNA水準をもった試料、正の対照テンプレート、または先行する増幅に由来する少量のDNAの持ち越しが、意図的に添加したテンプレートDNAが存在しない場合にもPCR生成物を生じうる。可能であるならば、すべての反応混合物は、PCR生成物の分析および試料調製から隔離された領域にて調製される。RNA/DNA調製、反応物の混合、および試料の調製において専用または使い捨ての容器、溶液およびピペット(好ましくはポジティブディスプレイメントピペット)の使用は、交差夾雑を最小化するであろう。ここに参考として取り入れるHiguchiおよびKwok, 1989, Nature, 339:237-238、およびInnisら、編、1990、「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」, Academic Press, Inc. San Diego, CA中のKwokおよびOrrego参照。

【0046】核酸増幅の交差夾雑を最小化する特定の方

法が、ここに参考として取り入れるPCT特許公開WO 92/01814および米国特許5,035,996に記述されている。該方法は、dUTP等の非慣用ヌクレオチド塩基を増幅生成物に導入し、持ち越し生成物を酵素的および/または物理化学的処理に付して生成物DNAを次の増幅についてテンプレートとして機能し得ないようにすることを含む。例えば、ウラシル-N-グリコシラーゼまたはUNGとしても知られているウラシルDNAグリコシラーゼは、ウラシル塩基を含むPCR生成物からウラシル残基を除去するであろう。該酵素処理は、夾雑するPCR生成物を分解し、増幅反応物を“滅菌”する作用をする。

【0047】核酸塩基、ヌクレオシドまたはヌクレオチドを指す場合に「非慣用」なる用語は、特定のポリヌクレオチド中に天然に生じる慣用の塩基、ヌクレオシドまたはヌクレオチド(例えばDNA[dA, dG, dC, dT]またはRNA[A, G, C, T])の修飾物、誘導体または類似体を指す。ウラシルは、RNA(すなわちリボヌクレオチド中のリボースに共有結合する)において慣用の塩基であるが、DNA(すなわちデオキシリボヌクレオチド中のデオキシリボースに共有結合する)においては非慣用の塩基である。結合RT/PCR反応において、RT工程の前の反応物を、滅菌して先の逆転写および/または増幅反応の核酸生成物を除去しておくことが望ましい。逆転写後、かつPCR前の滅菌は、夾雑生成物に加えて、dUTPを含む非夾雑cDNA生成物の分解ももたらす。dTTPの存在下、かつdUTPの非存在下でのcDNA合成は、非実用的である。dUTPを引き続くPCR生成物に効率的に取り込むためには、逆転写工程に由来する持ち越しとしてのdTTPを希釈するために、大過剰量のdUTPが必要であろう。更に、このことは、dUTP添加のためにチューブの開封を必要とする。従って、UNG滅菌の有効性が損なわれる。

【0048】本発明は、RT/PCR反応物の滅菌方法を提供するものである。例4は、本発明のこの側面を例示する。非慣用ヌクレオシドが増幅生成物に取り込まれた場合に、通常の力価測定実験は、反応条件を最適化するために有用であり、ヨーロッパ特許出願EP-A-540,693は、非慣用ヌクレオチドの取り込みに関して指針を与える。変化するパラメータは、限定されるものではないが、2価陽イオン濃度、pH範囲、DNAポリメラーゼ濃度、非慣用ヌクレオシド濃度、非慣用ヌクレオチドが挿入されるべき天然ヌクレオチドの添加、各サイクルの時間および温度を含む。

【0049】一般に、トリス緩衝溶液中でMgCl₂を使用するPCRにおいてdNTP濃度は、各dNTPについて20-200μMの範囲である。dUTPの取り込みのためには、上昇させたヌクレオチド濃度において増幅効率が改善される。例4において、PCR中のdU

(10)

特開平7-59599

17

TP濃度は、200 μ Mであり、dCTP、dGTPおよびdATPも同じ濃度で存在するが、これは本質的ではない。dUTPまたはdNTP濃度を増大させた場合、MgCl₂、およびMnCl₂、濃度も付随して増大せられる。例4において、PCRはdGTP、dATP、dUTPおよびdCTPをそれぞれ200 μ M、ならびに2 mMのMgCl₂、を含み、効率的増幅を与えている。

【0050】熱安定性ポリメラーゼを使用する逆転写のためには、Mn²⁺が2価陽イオンとして好ましく、典型的には例えば塩化マンガン(MnCl₂)、酢酸マンガン(Mn(OAc)₂)または硫酸マンガン(MnSO₄)等の塩として含まれる。MnCl₂が、10 mMトリス緩衝溶液を含む反応物に含まれる場合に、MnCl₂は一般に0.5-7.0 mMの濃度で存在し、dGTP、dATP、dUTPおよびdCTPをそれぞれ200 μ M使用する場合、0.8-1.4 mMが好ましく、1.2 mM MnCl₂が最も好ましい。本発明は、2価陽イオン濃度の使用可能な範囲を拡大する方法および試案を提供する。本発明の一実施態様において、Mn(OAc)₂、ピシン-KOHおよびKOA cを含む反応用緩衝溶液を、MnCl₂、トリス、KCl緩衝溶液に代えて使用した。例8は、Mn(OAc)₂として供給されるMn²⁺が1.2-2.5 mMの範囲の濃度で使用されるピシン/アセテート緩衝溶液の使用を記述し、例10に記述されるRT/PCRにおいては、3.6 mMおよび3.5 mMの濃度が使用されている。

【0051】非償用ヌクレオチドおよび2価陽イオンの至適濃度は、全dNTP濃度、ならびに存在する特定のプライマー、テンプレート、緩衝溶液、塩類、およびポリメラーゼに依存して上述の増幅反応と同様に逆転写反応でも変化する。例は、逆転写反応において高濃度のdNTPを許容し、これによって新たに合成されるcDNAへのdUTP取り込みを増大するピシン/アセテート緩衝溶液の使用を記述する。

【0052】例3に記述される本発明の一実施態様においては、RTおよびPCR工程の両者について、トリス-HCl緩衝溶液中の2価陽イオンとしてMnCl₂を使用する結合RT/PCRに対して2工程1添加方法が提供される。この方法において、逆転写に次いでPCR工程の前に緩衝溶液の調整が行われない。従って、dTTPまたはdUTP(200 μ Mを使用)のいずれを取り込む場合にも、PCRの際にMnCl₂の濃度が1.2 mMに維持された場合に起こりうる増幅効率の低下をさけるために、より低濃度のMnCl₂が使用される。

【0053】増幅およびRT/PCR結果の分析に次いで、RT/PCR生成物は本意に他の反応中に夾雑物として導入されうる。引き続きRT、RT/PCR、または増幅反応に先だって、該反応物は、先行するRT/PCRの際に取り入れられた非償用ヌクレオチドに対し

18

て特異的なDNAグリコシラーゼにより処理される。こうして標的核酸を含む引き続くRT、RT/PCRまたは増幅反応混合物中に夾雑物として存在するいずれの先行するRT/PCR生成物も加水分解される。

【0054】従って、實際上RT/PCRに先行して滅菌処理が行われ、生成物DNAを含むdUMPの持ち越しが除去される。例えば、逆転写反応物の高温度(60-70℃)インキュベーションに先行して、RT反応物の体積 μ lあたり、0.01-0.05単位のUNGが添加され、室温にて1-10分間インキュベートされる。他の方法として、インキュベーションは50℃にて2分間行われる。引き続き高温度(60-70℃)RTおよび95℃の変性工程は、新たに合成されるcDNAおよびPCR生成物が分解されないようにUNGの不活性化を行う。UNGは、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。EP-A-540,693は、組換え手段によるUNGの製造方法、およびDNA試料の変性温度以上の加熱後には活性を再度獲得することがない熱変位性UNG誘導体が記述されている。そのような誘導体は、本発明の実施のために好適であろう。

【0055】増幅の標的は、RNA/DNAハイブリッド分子であり得る。該標的は、単鎖または二重鎖核酸であり得る。上述のPCR法は、二重鎖標的を仮定して記述したが、これは必要条件ではない。単鎖DNA標的の第1の増幅サイクルの後、該反応物は、単鎖標的および新たに合成された相補鎖からなる二重鎖DNA分子を含む。同様に、RNA/cDNA標的の第1の増幅サイクルに次いで、該反応混合物は二重鎖cDNA分子を含む。この点において、増幅の引き続くサイクルは、上述したように進行する。本発明の方法において、増幅の標的は単鎖RNAであり、第1の増幅サイクルは、逆転写工程である。別の方法として、出発のテンプレートが二重鎖RNAである場合には、最初の高温度変性工程が単鎖RNAテンプレートの調製のために使用される。

【0056】ここにおいて使用されるように「cDNA」なる用語は、リボ核酸鎖(RNA)をテンプレートとして合成される相補的なDNA分子を指す。RNAは、mRNA、tRNA、rRNA、またはウイルスRNA等のRNAの別の形態であってもよい。cDNAは、単鎖、二重鎖またはRNA/cDNAハイブリッドのように相補的RNAと水素結合するものでもよい。

【0057】本発明の方法は、所望の最終生成物が従来方法よりも高い特異性を持って生成される所望のRNAテンプレートからcDNAを得る方法を提供する。更に、本発明ではcDNA合成がPCRによる増幅と結合される。これらの方法は、熱活性DNAポリメラーゼの従来知られていなかった性質を取り入れるものである。開示される実施態様において、TaqおよびTth DNAポリメラーゼを逆転写に使用する方法が提供される。

(11)

特開平7-59599

19

20

これらの実施態様は、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【0058】熱安定性ポリメラーゼは、多くの供給元から入手可能である。酵素は、天然または組換えタンパク質であつてよい。好ましい熱安定性酵素は、*Thermus thermophilus* から精製される *Thermus thermophilus* DNAポリメラーゼで

A SEQ ID No. 1: 5' -GGCATATGGCTAGACTATT
TCTTTTGTG-3'

B SEQ ID No. 2: 5' -AGGTTCCGATGAAGTCTGT
AGGTGATGTCTG-3'

C SEQ ID No. 3: 5' -CTACAGACTTCATCGGAAC
CTCCTTAAGCG-3'

D SEQ ID No. 4: 5' -CCAACCCGCCTCGGCCACG
AAGG-3'

【0060】組換え *Tth* ポリメラーゼは、*rTth* DNAポリメラーゼと記される。*Taq* DNAポリメラーゼもまた本発明の実施に好適である。*Taq* DNAポリメラーゼは、Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、Perkin Elmer, Norwalk, CT から市販されている組換え製品または *Thermus aquaticus* から天然 *Taq* DNAポリメラーゼとして生成されたものが商業的に入手可能である。ここにおいて使用されるように、組換え *Taq* DNAポリメラーゼは *rTaq* DNAポリメラーゼと記されてよく、また天然 *Taq* DNAポリメラーゼは、*nTaq* DNAポリメラーゼとして記されてもよい。更に、Amersham, Arlington Heights, IL から "Hot Tub" DNAポリメラーゼとして入手可能な *T. flavus* (*Tfi*) DNAポリメラーゼが好適であり得る。逆転写および核酸増幅への *Tth* DNAポリメラーゼの使用の詳細については、WO91/09944に見いだされるであろう。

【0061】プライマーは、その5'末端またはその近傍に位置する便利な制限酵素認識配列を伴って設計される。*c* DNA転写物の形成において、プライマーの3'末端が標的配列に水素結合している限り、得られた二重鎖 *c* DNA分子は特定の制限酵素認識配列を含むであろう。*c* DNAをテンプレートとして使用して増幅後、該制限部位は例えばクローニング等の別の処理を容易にするために使用されう。

【0062】熱活性または熱安定性DNAによるRNAの逆転写の後、該RNAは、RNA/*c* DNAハイブリ

ある（ここに参考として取り入れるPCT特許出願公開WO91/09950参照）。別の方法として、*Tth* DNAポリメラーゼは、組換え宿主細胞から生成され、該宿主細胞は、WO91/09944に記述されているように、下記プライマーを使用して調製されう：

【0059】

ッドから熱変性またはアルカリ、熱または酵素処理等の多くの既知の手段により除去されう。酵素処理は、例えばRNA/*c* DNAハイブリッドをRNaseHで処理することを含んでよい。RNaseHは、RNA/DNA二重鎖中のRNA鎖に特異的である。*Tth* および *Taq* に伴われるRNaseHおよび5'→3'ヌクレアーゼ活性は、*c* DNA配列増幅のためのプライマー伸長に加えて、RNAテンプレートの加水分解および第2のDNA鎖合成を容易にする。別法としては、外部的RNaseHを商業的に入手可能な供給元から添加してもよい。

【0063】熱安定性ポリメラーゼのRNaseH活性は、試料中のRNAとDNAとを識別する手段を提供する。このことは、類似する二重DNAの存在下でRNAを検出するために特に有用である。DNAが例えばプロウイルスHIVのDNA等、イントロンを含まない場合には、増幅RNAとDNAとは大きさにおいて区別不可能である。しかしながら、逆転写の後、熱安定性RNaseH活性は、RNA/*c* DNA二重鎖の変性の必要性を取り除く。従って、ゲノムまたはプロウイルスDNAの存在下で、RNAテンプレートのみが第1のPCRサイクルにおいて増幅される。

【0064】類似するRNAおよびDNAテンプレートの間を識別する好ましい方法において、増幅プライマーは、低い鎖分離温度によるPCR生成物の合成を支配するために使用される。例えば、下記プライマー対はHIV RNAを検出するために、94℃よりも十分に低い温度で変性するPCR生成物を生じる：

【0065】

プライマー SEQ ID No.

配列

(12)

特開平7-59599

21	22
SK462	5
SK431	6
SK38	7
SK39	8

5'-AGTTGGAGGACATCAA
GCAGCCATGCAAAT-3'
5'-TGCTATGTCAAGTTCCC
CTTGGTTCTCT-3'
5'-ATAATCCACCTATCCC
AGTAGGAAGAAAT-3'
5'-TTTGGTCCTTGCTTA
TGTCCAGAATGC-3'

【0066】PCRのための典型的変性温度は、94-96℃である。低下された温度においては二重鎖DNA（すなわち予想される夾雑物）は変性せず、従って増幅されない。PCR生成物の変性温度に影響を与える方法は、ここに参考として取り入れるヨーロッパ特許出願E P-A-519, 338に詳細に記述されている。

【0067】別の方法において、非慣用ヌクレオチドは、PCR生成物の変性温度に影響を与えるために有用である。例えば、ヒドロキシメチルdUTP (Hmdutp) は、SP01ファージDNA中にチミンに代えて5' ヒドロキシメチルウラシル (HmUra) として天然に生じる (Kallénら、1962, J. Mol. Biol. 5: 248-250、ならびにLevyおよびTeebor、1991, Nuc. Acids Res. 19 (12): 3337、両者をここに参考として取り入れる)。HmUraを含むゲノムは、対応するチミンを含むDNAより10℃低い温度で融解する。HmdutpのcDNAへの取り込みは、逆転写生成物およびPCR二重鎖DNA生成物の両者の変性温度を、類似するチミン含有DNAの変性温度に比べて効果的に低下させる。DNA生成物のT_mに効果を及ぼしうる他の修飾ヌクレオチド三リン酸（例えば、ε7dGTP、7-デアザ-2' デオキシグアノシン5'-三リン酸またはα-ホスホロチオエートdNTP）は、類似するRNAおよびDNAテンプレートとを区別するために好適である。

【0068】RNAテンプレート鎖の除去または融解の後、残るcDNA鎖は、自己相補鎖のポリマー化のためのテンプレートとして機能し、更なる増幅、検出または他の操作に好適な二重鎖cDNA分子を与える。第2鎖の合成もプライマーを必要とする。配列特異的プライマーを第2鎖合成を開始するために反応混合物中に導入しうる。別法として、二重鎖アダプターリンカーをcDNAに連結してもよく、あるいはcDNAをターミナルトランスフェラーゼ型活性によりテイリングしてもよい。第2鎖プライマーは、特定のcDNA配列よりむしろ尾部にハイブリッドすることを必要とする（例えば前述のInnisらの文献中のFrohman参照）。開示される方法の実施において、特定のcDNA分子の合成のための第1のプライマーの組、および所望のcDNA分節の増幅のための第2の帰巢するプライマーの組の使用

が望ましい。これらのすべての反応は、同じDNAポリメラーゼによって触媒作用を受ける。

【0069】本発明によれば、逆転写のためにプライマー-テンプレート混合物が適当なポリマー化条件で熱活性または熱安定性ポリメラーゼと共にインキュベートされる。これらの条件は、4種すべてのデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) ならびに緩衝剤、2価陽イオン、および1価陽イオンを含む緩衝溶液を含んでなる反応混合物によって与えられる。

【0070】DNAポリメラーゼは、触媒活性のために2価陽イオンを必要とする。ここに参考として取り入れるTaborおよびRichardson、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4076-4080は、DNA配列決定法においてMg²⁺をMn²⁺に置換可能であることを報告している。これらの方法ではDNAテンプレートおよびT7 DNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼIが必要である。

【0071】Mn²⁺、Mg²⁺またはCo²⁺のいずれもがTaq、TthおよびTma DNAポリメラーゼを活性化しうる：しかしながら、Mn²⁺が本願方法では好ましい。本願の開示される実施態様においては、RNAからの核酸の逆転写のためにMn²⁺を含む緩衝溶液が与えられる。これらの緩衝溶液は、従来の逆転写緩衝溶液より改良されており、増加したcDNA収率をもたらす。特に、RNA増幅のためにTth DNAポリメラーゼおよびMnCl₂またはMn(OAc)₂を使用する本願方法の実施においては、MgCl₂、および標準PCR条件に比べて少なくとも10⁶倍の感度の上昇がもたらされた。RNAテンプレート依存DNA合成を活性化することは可能であるが、混合2価陽イオン緩衝溶液（例えばMn²⁺およびMg²⁺）は、感度および効率を低下するため好ましくない。

【0072】2価陽イオンは、MgCl₂、Mg(OAc)₂、MgSO₄、MnCl₂、Mn(OAc)₂、またはMnSO₄等の塩の形態で供給される。トリス-HCl緩衝溶液において使用可能な陽イオン濃度は、MnCl₂について0.5-7mM、好ましくは0.5と2mMとの間であり、MgCl₂については0.5-10mMである。ピシン/KOAc緩衝溶液において使用可能な陽イオン濃度は、Mn(OAc)₂について1-

(13)

特開平7-59599

23

20mM、好ましくは2-5mMである。

【0073】好ましくは、1価陽イオンが、カリウム、ナトリウム、アンモニウム、またはリチウムの塩化物または酢酸塩により供給される。KClについては、至適濃度は反応に使用するポリメラーゼに依存して変化するが、1-200mMの濃度、好ましくは40-100mMの濃度である。TthDNAポリメラーゼを使用する場合、至適逆転写酵素活性は、50および75mMKClの間で観察される。しかしながら、KCl濃度を100mMまで増大した場合、向上したRT/PCRが観察される。Ampli Taq (登録商標) DNAポリメラーゼ等のTaq DNAポリメラーゼについては、50mMKClが好ましい。KOAcについては、TthDNAポリメラーゼを使用する場合に、85mM-115mMの濃度において至適逆転写酵素活性が観察された。

【0074】デオキシリボヌクレオチド三リン酸は、ジナトリウムまたはリチウムの塩として、dATP、dCTP、dGTP、dUTPおよびdTTPの塩溶液として添加される。本願方法において、それぞれ1μM-2mMの範囲の最終濃度が好適であり、100-600μMが好ましいが、ヌクレオチドの至適濃度は、逆転写反応において全dNTPおよび2価金属イオン濃度、ならびに緩衝液、塩類、特定のプライマーおよびテンプレートに依存して変化する。例えば1500bp以上のより長い生成物のためには、トリス-HCl緩衝液を使用する場合、各500μMのdNTPおよび2mMのMnCl₂が好ましい。

【0075】好適な緩衝剤は、水素イオンの緩衝作用、および好ましくは第5節に記載したようにpHとマンガニオン濃度との両者を緩衝する両性イオン化合物である。特に好ましい緩衝剤は、ピシン-KOHであり、好ましくはpH8.3であるが、pHは7.8-8.7の範囲であってよい。ピシンは、pH緩衝剤および金属緩衝剤の両者として作用する。

【0076】付加的に、0.5mM未満のEDTAが逆転写反応混合物中に存在してもよい。Tween-20TMおよびNonidetTM P-40等の洗浄剤が酵素希釈緩衝液中に存在する。非イオン性洗浄剤の最終濃度は、約0.1%またはそれ未満が適切であり、しかしながら0.01-0.05%が好ましく、ポリメラーゼ活性にも干渉しないであろう。同様にグリセロールが酵素調製物にしばしば存在し、一般に反応混合物中で1-20%に希釈される。蒸発防止のために鉱油のオーバーレイが添加されうるが、TC9600サーマルサイクラ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) を使用する場合、またはここに参考として取り入れるPCT特許公開WO91/12342およびChouら、1992, Nuc. Acids. Res. 20:1717-1723に記載されているように、AmpliwaxTM PCRGem100 (Perkin Elm

24

er, Norwalk, CT) を使用する場合には必要ではない。

【0077】本発明の一実施態様において、均質RT/PCRが提供される。この2工程、1添加方法は、初期試薬添加後にチューブを開く必要がない。従って、RTおよびPCR工程の間で汚染する機会が除かれる。しかしながら工程間で反応試薬を変更する機会が失われ、従って、2つの反応は、RTおよびPCR工程の両者に対して至適ではない同一の反応試薬条件下で行われる必要がある。反応条件の調節は、2つの反応工程の別個の要求に適合させる必要がある。例えば、至適RT活性のために要求される高い酵素濃度のために、短い標的を増幅する場合に、PCRサーマルサイクラにて10-30秒間の短い伸長サイクルが好ましいが、伸長サイクルの時間は、使用するサーマルサイクラに依存する。例えば、Perkin Elmer, Norwalk, CTが販売するTC480サーマルサイクラを使用する場合に、1分間が好ましい。

【0078】同様に、均質RT/PCRアッセイにおいては、RTおよびPCR工程の間に緩衝液調整が無い場合、個々の工程が機能するようにそれぞれのRTおよびPCRの至適条件の中間的マグネシウム濃度が必要とされる。例7に示されるように、至適濃度は、DNA標的のPCR反応の方がRNA標的のRT反応よりも低い。DNAテンプレート上で至適合成を与えるマンガニオン濃度は、約0.6mM (800μMの全dNTP、トリス緩衝液) であることが見いだされ、また酵素については、RNAテンプレート上での最大逆転写酵素活性が約1.4mMのマンガニオン (800μMの全dNTP、トリス緩衝液) にて得られた。例3に記載される均質反応については、MnCl₂濃度は、好ましくは1.0mM以下、最も好ましくは0.8mMである。好ましい濃度は、TthDNAポリメラーゼにRT/PCRを行う条件を与えるが、これらの条件は、逆転写およびDNA増幅の両者に対して準至適なものである。更に、dUTPの存在下でのRT工程の効率、本発明の滅菌方法と同様に、より高濃度のMnCl₂において改良されるが、PCR工程はより低効率である。従って、0.8mMのMnCl₂が最も好ましく使用され、また生成物は、エチジウム染色ゲルより高感度の検出方法、すなわちプローブハイブリダイゼーションまたは標識の取り込み、あるいは他の核酸検出法により検出される。

【0079】2つの工程のための異なった至適反応条件の問題を解く一方法は、PCT特許公開WO91/12342に記載されるように反応チューブ内において試薬を分離するために、高融点ワックス (72℃) を使用することを含む。高融点ワックスは、EGTAおよびMgCl₂溶液をR₁反応からワックス層により分離し、2つの個々の反応がそれら自体の最適条件にて起こることを本質的に可能とする。RT工程は、ワックスの融点よ

(14)

特開平7-59599

26

26

り低い温度で行われ、しかしてワックス層はそのまま維持され、RT工程は至適濃度のマンガンを使用して行われる。RT工程完了後、ワックスはPCRの最初の高温度変性工程の間に融解し、かくしてEGTAを放出してマンガンを優先的にキレートし、マグネシウムに基づくDNA増幅を可能とする。この技術の修飾は、EGTAおよびマグネシウムの同じ高融点ワックスのビーズ中へのマイクロカプセル化を含む。

【0080】本発明によれば、緩衝剤がキレート剤として作用する金属緩衝溶液を使用する。そのような緩衝溶液は、マンガンに結合し、従ってより高い Mn^{2+} 濃度の使用を可能とする。該金属緩衝溶液は、添加された広範囲の Mn^{2+} に亘って利用可能な Mn^{2+} 濃度を一定水準に維持しうる。本発明の方法で有用であり得る金属緩衝剤は、N, N-ビス(2-ヒドロキシメチル)グリシン(ピシン)、N[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(トリシン)、酢酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、N-ヒドロキシエチルイミノジ酢酸(HIMDA)、クエン酸塩およびイソクエン酸塩を含む。例示した緩衝剤の一つと同様な金属結合およびpH緩衝能力を与える緩衝剤の組み合わせも好適であり得る。ここにおいて使用されるように「緩衝剤」なる用語は、そのような緩衝剤の組み合わせも包含することを意味する。場合により、同様な緩衝効果は、緩衝剤の濃度を変更することによって達成されうる。例えば例13は、マンガンの範囲の拡大のために上昇させたトリス濃度の使用が記述されている。

【0081】キレート剤として作用する金属緩衝剤は、逆転写反応において金属イオンと錯体を形成する。キレート剤の金属に対する親和性を表すキレート剤-金属錯体の安定性は、「金属-緩衝剤結合定数」または「安定定数」 K_m として表される。安定定数が広範囲であることから、金属緩衝剤の K_m の対数(底は10、Logと記される)がより一般的に引用される。安定定数 K_m は、ここに参考として取り入れるGoodら、1966, Biochemistry 5:467-477、ならびにPerrinおよびDempsey、1974, "Buffers for pH and Metal Ion Control", Chapman and Hall, New Yorkの第7章に記述されて

緩衝剤	pKa	デルタpKa/℃	Log K_m (Mn^{2+})
トリス	8.3	-0.031	無視できる
ピシン	8.35	-0.018	3.1
トリシン	8.15	-0.021	2.7

【0085】ピシンおよびトリシンの温度に対する酸結合定数の変化(デルタpKa)は、トリス-HClよりも有意に低い。トリシンおよびピシンは、トリスで見いだされるpHの大きい温度依存性をも低減する。

【0086】トリシンおよびピシン緩衝剤は、DNAが

いる。本発明の方法で使用するマンガンに結合する適当な金属緩衝剤は、1と6の間のLog K_m (20℃、イオン強度0.1M)を有する(すなわち $10 < K_m < 10^6$)。好ましくは、Log K_m は2と4の間であり、最も好ましくは2.5と3.5との間である。種々のキレート剤の安定定数の資料は、ここに参考として取り入れるMartellおよびSmith、1974, "Critical Stability Constants", Plenum Press, New York, Voll; MartellおよびSmith、1977, "Critical Stability Constants", Vol 3, Plenum Press, New York, 160-162頁;ならびにSillenおよびMartell 1964, "Stability Constants of Metal-Ions Complexes" Spec. Publ. Chem. Soc. n17, p458, Londonに与えられている。

【0082】好ましい金属緩衝剤は、本発明の方法で要求されるpH範囲において水素イオン緩衝剤としても働きうる。前出のGoodらの文献は、金属陽イオンおよび水素イオンの両者に働く緩衝剤の種類を記述している。緩衝剤の酸解離定数 K_a は、前出のGoodら、1966およびPerrinおよびDempsey、1974に記述されている。緩衝剤は、Log K_a として定義して20℃かつ0.1Mのイオン強度において7および9の間、好ましくは7.5および8.5の間の K_a を有する。

【0083】本発明の方法で有用な緩衝剤は、N, N-ビス(2-ヒドロキシメチル)グリシン(ピシン)、およびN[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(トリシン)である。両者は、両イオン性脂肪族アミン;更に特定のには Mn^{2+} 結合力を与えるカルボキシル基で置換されたグリシンである。ピシン、トリシンおよびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス)の性質は、下記に示され、また前出のGoodら、1966に見いだされ、これは更に構造式を与える。すべての値は、20℃および0.1Mのイオン強度での値である。

【0084】

リメラーゼ取り込みアッセイにおける使用可能な Mn^{2+} 濃度範囲も拡大する。トリシンおよびピシンの濃度が増加するに従って、増加した Mn^{2+} 濃度におけるDNAポリメラーゼ活性の減少は、顕著ではなく、また至適 Mn^{2+} 濃度はより高濃度側に移行する。例7に示さ

れるように、50 mMのピシン-KOH緩衝溶液 (pH 8.3) 中でTth DNAポリメラーゼを使用して、0.4 mM~2.3 mMのマンガン濃度は、良好なDNAテンプレート上への取り込みを与えた。RNAテンプレートを使用すると、1 mM程度の低いMn²⁺濃度では、最大活性の約40%が観察された。活性は、マンガン濃度が1.0 mMから6 mMまで増大するに従って増大し、約6および12.5 mMの間でプラトーに達することが観察された。より高いMn²⁺濃度では活性が徐々に減少し、20 mMでは最大活性地の48%が観察された。

【0087】結合RT/PCRにおいて、DNA増幅工程については低い遊離のマンガンイオン濃度が必要とされ、しかしながら逆転写工程については高い遊離のマンガンイオン濃度が必要とされる。DNA増幅においては遊離のマンガンイオンのほとんどを錯合し、RT反応においては充分な遊離のマンガンを与えることにより全許容マンガン濃度を拡大する本発明のトリシンおよびピシン緩衝溶液の二重効果は、RT/PCRに重要な改善を与える。二重の範囲の拡大は、金属緩衝剤に関する一般理論および文献からは予想できず、このことは全く驚くべき結果である。

【0088】試料調製により持ち込まれるdNTP、プライマー、核酸、タンパク質、EDTAおよび他の多くの物質等、反応成分はマンガんにキレートする能力を有しており、従って、マンガンの厳密な濃度調節は極めて困難である。これらの成分は個々の研究者によって注意深く調整されうるが、診断および応用研究のためのこれらの試薬の大規模製造には厳しい制約がおかれる。金属緩衝剤トリシンおよびピシンの使用は、至適Mn²⁺濃度を上方に移行するのみならず、Mn²⁺濃度およびdNTP濃度の使用可能な範囲を拡大する。より高いマンガン濃度およびより広い範囲の濃度の使用が可能であることは、試薬製造の問題および反応中のマンガン濃度の厳密な調節の問題を緩和する。

【0089】トリシンの金属結合定数 (Log K_M) は無視できるものと考えられているが (前出のGoodら、1966)、RT/PCR中のトリス-HCl濃度の10 mMから100 mMへの増大は、RNA標的上のMn²⁺濃度範囲を拡大し得る。トリス緩衝溶液は、無視できる程度にMn²⁺ (および他のほとんどの金属) に結合すると考えられていたが、Morrison, 1979, Methods in Enzymol. 24b:53-68は、「250 mMにおけるMn-トリス錯体の解離定数は高いが、100 mMトリスおよび2 mM Mn²⁺溶液においては金属イオンのほぼ29%はキレート化している」ことを示した。例13は、PCR生成物が観察されるマンガン濃度範囲のかなりな拡大を与えるRT/PCRにおける100 mMトリスの使用を記述する。拡大される量は驚くべきものであり、金属緩衝剤お

よびトリシンの背景となる一般理論および文献からは予想し得なかったことである。

【0090】ピシンおよびトリシン緩衝溶液は、好ましくは、KClまたはKOAcのいずれかを1価陽イオンとして含む。ピシン/KOAc緩衝溶液は、ピシン/KCl緩衝溶液よりも僅かに低いイオン強度を有し、このことは高G+C含有量を有するテンプレートにおいて2次構造を不安定化する助けになる。反応に添加されるKOAcのpHは、金属緩衝剤およびpH緩衝剤の両者として作用するピシンが、反応のpHを適切に緩衝するため臨界的ではない。生成物は、KOAcをpH7.0と9.4との間で使用して観察され至適条件はpH7.5であった。50 mMピシン (pH8.3)、100 mM KOAc (pH7.5) および2.5 mM Mn (OAc)₂の溶液の最終的pHは、7.97である。

【0091】ピシン緩衝溶液は、長期間保存可能である。例えば、4℃において47日間保存した500 mMピシン、800 mM KCl、および21 mM MgCl₂の10X溶液を希釈した緩衝溶液を使用したRT/PCRにて形成された生成物は、新たに調製した緩衝溶液をしようしたRT/PCRの生成物と同等であった。ピシンは、金属イオンの溶解性を維持し、好適なピシン/KOAc/Mn (OAc)₂緩衝溶液をRT/PCRに使用することの更なる利点は、Mn (OAc)₂が、MnCl₂に比べてより低い溶解性を有していたであろうことである。従って、RT/PCRに有害なマンガン水酸化物および酸化物の沈殿を防止しうる。

【0092】本発明の滅菌方法は、RT/PCRがdUTPの存在下で行われることで特定される。ウラシルN-グリコシラーゼ (UNG) 滅菌の最大効率は、dUMPが夾雑テンプレート中にdTMPの代わりに取り込まれた場合に達成される。dUMPの取り込みを最大にするためには、Tth DNAポリメラーゼは、dTTPが存在する場合に逆転写に際してdUTPを約2倍程度差別するため、RT/PCRに対するdTTPの添加量を最小化することが望ましい。dNTPはMn²⁺に結合するため、遊離のMn²⁺濃度は、dNTP濃度に直接に関連する。遊離のMn²⁺濃度の緩衝は、dNTPによる更なるMn²⁺の結合を補うため、使用可能なMn²⁺濃度範囲を増大するピシン/KOAc緩衝溶液は、所定のMn²⁺濃度において使用されるdNTPの増大した濃度を許容する。ピシン/KOAc緩衝溶液は、全dNTP濃度の増大を許容するのみならず、RT/PCRに際して使用されるdUTPのより高い相対濃度も許容し、Tth DNAポリメラーゼによる逆転写工程におけるdUTPの取り込み水準を増大させる。このことは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のようにアデニン残基の割合が大きいRNA標的において特に有利である。

【0093】本発明のピシンおよびトリシン緩衝溶液の

更なる優位点は、それらが滅菌方法の効率を増大することである。2価金属陽イオンおよび高いイオン強度はUNGを阻害することが知られている(ここに参考として取り入れるLindahlら、1977, J. Biol. Chem. 252(10):3286-3294、KrokanおよびWitter, 1981, Nucleic Acids Res. 9(11):2599-2613、ならびにCaradonnaおよびCheng, 1980, J. Biol. Chem. 255(6):2293-2300)。好適な緩衝剤は、遊離の金属イオン濃度および全イオン強度の両者を低減し、これによって、UNGに対する緩衝剤の阻害効果を最小化し、かつ反応混合物の滅菌効率を改善する。

【0094】金属イオン触媒によるRNAテンプレートの加水分解は、RT反応の効率を低減し、逆転写されるテンプレートの長さを制限する。テンプレート加水分解の問題は、本願方法のRT工程での高温により悪化される。RNAテンプレートの加水分解を最小化するトリス緩衝液中のMnCl₂を使用する方法および反応条件は、例において与えられ、またここに参考として取り入れるMyersおよびGefand, 1991, Biochemistry 30:7661-7666に議論されている。好適なピシン/KOAc緩衝液は、マンガンと錯体形成し、より少量の金属触媒RNA加水分解が、昇温下で起こるにすぎない。更に、これらの緩衝液を使用した場合には、RNAの15秒間、95℃でのブレインキュベーションを含んで全長の標的RNAの付加的損失はあってもほとんど起こらない。該好適緩衝液は、RT工程における効率増大のための逆転写反応時間の増大を許容し、また逆転写に先行して高度の2次構造を開放すべくRNAを変性するための、あるいは二重鎖RNAが増幅されるべき場合に、逆転写のために単鎖テンプレートを与えるべくテンプレートを変性するための高温でのブレインキュベーションを含むことを許容する。更に、低減されたRNA加水分解は、RNAテンプレートが逆転写の完了前に分解される機会を減少させ、これによってTthDNAポリメラーゼを使用する長い(>2kb)cDNAの合成を容易にする。

【0095】本願方法は、試料中にRNAが存在することのみを必要とする。例においては、バクテリオファージT7プロモータを含むプラスミドを使用して調製された合成RNAが、本発明の方法によって逆転写され、増幅される。他の例において、全細胞RNAの異種群が、特定のmRNAの逆転写および増幅のために使用される。本発明の実施のためには、試料中に存在するRNAの量は、一般的に0.1pg~1μgの範囲内である。必要量および結果は、試料RNAの複雑さ、および使用する検出の形式に依存して変化するであろう。高温逆転写反応の特異性故に、標的RNA分子1~10⁵個が、マイクログラム量またはそれ以上のPCR生成物

を与えるために充分である。いくつかの開示する例において、増幅生成物は、5%の全反応混合物のゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色によって可視化された。従って、必要とされる増幅標的の量は、生成物の別のアッセイ手段が使用される場合に実質的に低減される。例えば、電気泳動されたPCR生成物の検出に好適な同位体標識DNAプローブは、検出感度を増大し、従って、増幅生成物の検出に必要な増幅量またはサイクル数を減少する(例えば試料中に標的RNAを1~10⁵分子)。

【0096】好ましくは、20μlの10mMトリス-HCl逆転写反応物中に存在するRNAの量は、10pg~500ngであり、最も好ましくは、0.1~300ngである。試料が300ng以上のRNAを含む場合には、RNAテンプレートからの全長cDNA生成物の転写を確実にを行うため、付加的な酵素を含むことが好ましいであろう。しかしながら、逆転写反応がPCRと結合される場合には、PCR反応における高い酵素濃度の効果が考慮されなければならない。例えば、TaqDNAポリメラーゼが熱活性ポリメラーゼとして使用される場合には、高い酵素濃度は、非特異的PCR生成物および低減した収率をもたらしうる(ここに参考として取り入れる「PCR Technology」Erlich編、1989, Stockton PressのSalki参照)。高い酵素濃度から生じうる問題は、逆転写反応と増幅反応との間で熱活性DNAポリメラーゼを不活性化することにより容易に回避される。不活性化は、cDNA合成反応混合物を99℃にて3~10分間インキュベートすることにより達成される。次いで適切な量の熱安定性DNAポリメラーゼを反応混合物中に添加し、通常通りPCRを行う。この方法は、2つの反応のそれぞれについて異なる熱安定性DNAポリメラーゼが使用される場合にも好適である(WO91/09944の例VII参照)。

【0097】ここに記述されるピシン緩衝液の優位点は、より大量のRNAが、逆転写反応物中に存在しうることである。ピシン緩衝液およびdTTPを使用する場合に、50μlの反応物に対して、好ましいRNAの量は、1μgまでである。好ましい範囲において、1~10単位の熱活性DNAポリメラーゼが、完全長cDNA生成物を与えるためには十分である。完全長cDNAを優勢に得るために、テンプレートに対する酵素の比は、好ましくは0.5より大である。

【0098】TthまたはTaqDNAポリメラーゼを使用するRT/PCR法の優位点は、効率的逆転写および増幅のためにDNAポリメラーゼのより低いモル濃度が必要とされることである。例えば、各単位の活性は1.0pmoleのE. Coli DNAポリメラーゼを要求するが、これに対し、僅かに0.043pmoleのTaqDNAポリメラーゼ、ま

たは約20~25倍少量のタンパク質を必要とするのみである。例3は、約15nMのDNAポリメラーゼ濃度に対応する20μlの反応物中で5単位のTthDNAポリメラーゼを使用する均質RT/PCRを記述している。好ましいピシンおよびトリシン緩衝溶液を使用し、DNAポリメラーゼの量は、更に低減されうる。例8、10および12は、約6nMのDNAポリメラーゼ濃度に対応する100μlの反応物中で10単位のrTthDNAポリメラーゼを使用する均質RT/PCRを記述している。更にここに記述される1酵素RT/PCRは、3SR等の多酵素増幅系に比べて、かなり少量の全タンパク質が反応物中に必要となる（前出のKwohら、前出のGuatelliおよびPCT特許公開WO 92/0880A）。40ng（10単位）のrTthDNAポリメラーゼを含む100μlのRT/PCR反応が例示されているが、これに対して100μlの3SR反応は、1.44μgの酵素（0.6μgのAMV-RT、0.83μgのT7RNAポリメラーゼ、および0.01μgのE.coliRNaseH）を含み、あるいは36倍多いタンパク質を含む。均質RT/PCRにおける全タンパク質量の低減および1酵素のみの使用は、試薬製造および品質管理の問題をかなり単純化する。

【0099】一旦RNAを含む試料が調製され、適当なプライマーおよび塩類が添加されると、該反応物は、熱活性DNAポリメラーゼと共に1-60分間インキュベートされる。しかしながら、通常2~30分間の反応時間が好適である。標的分子が長い場合、または標的RNAに対する全RNAの比が高い場合、例えば、100コピーの標的RNAが250ngの全RNA中に存在する場合には、10-30分間のインキュベーション時間が好ましい。

【0100】プライマーおよびRNAテンプレートの両者を逆転写反応混合物に添加した後、熱活性DNAポリメラーゼを添加することが必須ではないが好ましい。別法として、例えば酵素およびプライマーを最後に添加するか、あるいはMnCl₂またはテンプレートおよびMnCl₂が最後に添加される。一般的に、ポリマー化活性に必須の少なくとも1成分は、プライマーおよびテンプレートが共に存在し、酵素が所望のプライマー/テンプレート基質に結合し、伸長しうる時点まで存在させないことが好ましい（ここに参考として取り入れるヨーロッパ特許出願EP-A-515,506）。

【0101】本発明方法の実施において、反応混合物は40℃より高温で、好ましくは55-75℃にてインキュベートされる。この温度にて、プライマー-テンプレートアニール化の特異性は、底温度でのアニール化特異性よりも向上し、また熱活性酵素は、昇温下でより高い活性を有する。上昇された温度は、分解された元々の核酸による、および阻ったプライマー-テンプレートハイ

ブリッド形成による非特異的プライミングを減少させる。

【0102】逆転写に引き続いて、RNAテンプレートは分解されるが、別法として変性されて過剰の単鎖DNA分子を生じる連続転写のためのテンプレートを提供する。この過剰の単鎖DNAは、標準的プローブハイブリッド技術により検出可能である。従って、本発明は、標的分節の直接検出法を提供する。得られた核酸生成物は、種々の電気泳動的またはクロマト的手段により検出可能である。放射標識三リン酸塩の使用は、反応の程度および形成される生成物の大きさを監視するために有用であるが、このことは本発明の要素として本質的ではない。

【0103】逆転写反応生成物は、PCRによる増幅のためのテンプレートとして好適である。本発明の一実施態様において、高温逆転写インキュベーションに続いて、該逆転写反応物はPCR緩衝条件に調節され、増幅反応が第2のプライマーの添加に続いて開始される。PCR緩衝溶液は、適切な緩衝能力、pH、1価陽イオン濃度を維持し、酵素濃度およびdNTPを各dNTPが20-200μMの範囲となるように希釈すべく添加される。MgCl₂は1-3mMの最終濃度に添加される。好ましくは、dNTPの濃度は逆転写およびPCR反応の両者について平衡する。Mn²⁺は高濃度で存在する場合にPCR増幅を損なうため、本発明の好ましい実施態様においてはMn²⁺はPCR増幅に先立ってキレート化される。高濃度のMn²⁺の存在は、増幅に際しての正確さをも低減するが、Mn²⁺のキレート化はこの問題をも回避する。従って、好ましい実施態様においては、逆転写反応に次いでMn²⁺をキレート化するためにMn²⁺のモル濃度の1-3倍の濃度でEGTAが添加される。Mg²⁺およびMn²⁺の存在下において、EGTAは優先的にMn²⁺に結合する。ここに記述されるように、低いdNTPおよびMg²⁺は、増幅に際してTthDNAポリメラーゼの信頼性を増大する。酵素の安定性を増すために、グリセロールおよび非イオン性洗浄剤（例えばTween-20）を、それぞれ最終濃度1-20%、および0.01-0.05%まで添加してもよい。

【0104】別の好ましい実施態様において、PCRに先行してMn²⁺はキレート化されない。上述したようにMg²⁺が好ましいが、PCRはMg²⁺に代えてMn²⁺を使用しうる。特に、例えば大規模な診断的スクリーニングへの応用について、増幅に際しての信頼性および起こりうるテンプレートの加水分解の低い水準等のリスクは、均質RT/PCR法が提供する絶大な優位点から見て容易に耐えうる。2工程単一添加方法は、試料処理を最小化し、交差夾雑の可能性を低減する。MnCl₂は、PCR効率に影響するため、至適濃度は使用される特定の反応成分：プライマー、標的濃度、dNTP

(18)

特開平7-59599

33

濃度、緩衝溶液、塩類等について標準法により滴定することが好ましい。本発明の好ましい実施態様において、 $Mn(OAc)_2$ を含むピシシ/KOAc緩衝溶液が使用され、これは広範囲の Mn^{2+} およびdNTP濃度を許容する。

【0105】ここに提供される方法は、特に分子生物学および医療診断の分野で多くの応用を有する。記述される逆転写酵素活性は、RNAテンプレートからcDNA転写物を与える。RNA分子からのDNA分節の調製および増幅方法は、RNA分子が全RNA母集団の一員である場合、または生物学的試料中に少量存在する場合に好適である。試料中に存在する特定のRNA分子の検出は、ここに記述される方法において使用される熱活性または熱安定性DNAポリメラーゼによってかなり容易とされる。特異性の絶大なる向上は、希少な標的を検出するための「偽陽PCR」の必要性を取り除く。特定のRNA分子、またはRNA分子の全母集団が、ここに記述されるように熱活性または熱安定性酵素を使用して増幅され、定量され、単離され、また所望によりクローン化され、配列決定される。

【0106】本発明の方法および組成物は、RNAをDNA生成物に逆転写する従来方法に対して大いなる改良である。RNAテンプレートから出発した場合、これらの方法は向上した特異性を有し、PCR増幅のためのテンプレートを従来利用可能であった方法より効率的に提供する。本発明は、感染症、遺伝子疾患または細胞性疾患等に伴う特定のリボ核酸配列を検出し、または特徴づけるためのより特異的な、従ってより正確な手段を提供する。

【0107】当業者は本発明の組成物がキット中に組み入れ得ることを認識するであろう。而して本発明は、水

DM158 SEQ ID No. 9:

5' - TGGAGAAGACCACTTGTGCTCCA - 3'

DM151 SEQ ID No. 10:

5' - GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC
- 3'

DM152 SEQ ID No. 11:

5' - CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC
- 3'

TM01 SEQ ID No. 12:

5' - GCTTGCAAGCTTTATTTAGTTATGACT
GATAACACTC - 3'

【0110】例1
結合RT/PCR反応におけるTaqポリメラーゼとTthポリメラーゼとの比較

【0111】WO91/09944の例VIIに記載のcRNA標準の使用は、反応混合物中に存在する標的

34

素緩衝作用および好ましくは2価陽イオン濃度の緩衝をも与える両イオン性化合物である好適な緩衝剤を含む緩衝溶液、および熱活性DNAポリメラーゼを、好ましくはRNAの逆転写のための使用方法を記述した指示書と共に含むキットに関する。一実施態様において、そのようなキットは試料中の少なくとも1つの特定の標的RNA配列の検出に関するものであり得る。そのようなキットは、上述の要素に加えて、特定の標的RNA配列に対してハイブリダイズするに充分に相補的な配列を含むプライマーを含んでなる。試料中の少なくとも1つの特定のRNA配列の増幅および検出のための診断キットは、第2のcDNA鎖合成を開始させるために合成されるcDNAの第1鎖に対してハイブリッドするに充分な程度にRNA標的と同等である配列を有するプライマーを含んでよい。キットは、上述の成分に加えて、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、ここに記述される適当な緩衝剤、オリゴ(dT)、RNaseH、クローニングのためのリンカー、ならびに1種以上の制限酵素を含んでよい。

20 【0108】例示のために提供される以下の例は、本願に開示される発明をなんら制限して解釈されることを意図するものではない。これらの例において使用される材料および方法の更なる詳細は、WO91/09944に見いだされるであろう。特に、WO91/09944は、合成テンプレートpAW106ならびにプライマーDM156 (SEQ ID No. 9)、DM151 (SEQ ID No. 10)、DM152 (SEQ ID No. 11)、TM01 (SEQ ID No. 12)の詳細な情報を提供し、ここにおいてこれらのプライマーの配列は以下の通りである：

【0109】

子の数が既知であるため、RT/PCR効率についての実験条件の効果の直接分析に便利である。特に、結合RT/PCRにおけるTthおよびTaqポリメラーゼの効率を比較した。

【0112】RT反応物(20μl)は、10mMのト

リス- HCl 、 $\text{pH} 8.3$; 90 mM の KCl (Ta q を含む反応物については 40 mM) ; 1.0 mM の MnCl_2 ; 各 $200 \mu\text{M}$ の dATP 、 dCTP 、 dGTP 、および dTTP ; 15 pmol の DM152 (SEQ ID No. 11) および 5 単位の Tth または Ta q ポリメラーゼならびに pAW109 cRNA の 10^6 、 10^5 または 10^4 コピーを含む。6個の反応物に $75 \mu\text{l}$ の鉱油を被せ、 70°C にて 15 分間インキュベートした。

【0113】逆転写反応に続いて、 10 mM のトリス- HCl ($\text{pH} 8.3$)、 100 mM の KCl (Ta q を含む反応物には 50 mM)、 1.88 mM の MgCl_2 、 0.75 mM の EGTA 、 5% グリセロール [v/v]、および 15 pmol のプライマー DM152 を含む $80 \mu\text{l}$ の溶液を添加した。次いで、試料 ($100 \mu\text{l}$) を $\text{Perkin Elmer, Norwalk, CT}$ のサーマルサイクラにて以下のように増幅した: 1 サイクルについて 95°C にて 2 分間; 95°C にて 1 分間および 60°C にて 1 分間を 35 サイクル; ならびに 60°C にて 7 分間を 1 サイクル。PCR増幅物の分別量 ($5 \mu\text{l}$) を、エチジウムブロマイドにより染色される 2% (w/v) NuSieve (登録商標) 1% (w/v) Seakem (登録商標) アガロース上の電気泳動にて分析した。

【0114】結果

rTthDNA ポリメラーゼは、標的 cRNA の 10^4 コピーから出発してエチジウムブロマイド染色ゲル電気泳動にて見える 308 bp 生成物を生じた。 Ta q ポリメラーゼについては、標的の 10^4 および 10^5 コピーでは生成物が観察されなかったが、エチジウムブロマイド染色でなくしてハイブリッド技術を使用すれば、より低い検出限界が予想された。これらの結果は、同様な反応条件下での結合逆転写PCR増幅においては、 TthDNA ポリメラーゼが類似する Ta qDNA ポリメラーゼよりも約 100 倍高感度を与えることを示している。

【0115】例2

好ましい非均質逆転写/PCRプロトコール

A. 逆転写反応

【0116】 0.5 ml のマイクロ遠心チューブに、 $9.4 \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水; $2 \mu\text{l}$ の $10 \times \text{rTthRT}$ 緩衝液; $2 \mu\text{l}$ の MnCl_2 (10 mM) ; それぞれ $0.4 \mu\text{l}$ の dGTP 、 dATP 、 dTTP および dCTP (それぞれ 10 mM) ; $2 \mu\text{l}$ の rTthDNA ポリメラーゼ、 $2.5 \text{ U}/\mu\text{l}$; $1 \mu\text{l}$ のプライマー DM152 (SEQ ID No. 11) ($15 \mu\text{M}$) (または別法として下流側プライマー) ; ならびに $2 \mu\text{l}$ の正の対照RNAまたは 250 ng 以下の全RNAを含む実験試料をあわせる。

【0117】この実施態様において、正の対照RNAは、 DM152 (SEQ ID No. 11) のテンプレ

レートとして作用する。対照RNA濃度は、好ましくは $\sim 10^4$ コピー/ $20 \mu\text{l}$ である。例えば対照RNAは、 10 mM のトリス- HCl 、 $\text{pH} 8.0$ 、 1 mM の EDTA および 10 mM の NaCl 中の $30 \mu\text{l}/\text{ml}$ の E. coli rRNA に含まれる pAW109 からの転写物であってよい。

【0118】全逆転写反応物の体積は試料あたり $20 \mu\text{l}$ であるべきであった。蒸発または環流を低減するために、混合物を $50-100 \mu\text{l}$ の鉱油で覆った。 $\text{Perkin Elmer, Norwalk, CT}$ のサーマルサイクラ内のチューブをソークファイルを使用して 70°C にて $5-15$ 分間インキュベートした。該チューブを氷上に置いて必要となるまで反応を停止した。

【0119】B. PCR反応

各試料について、最小 $80 \mu\text{l}$ のPCRマスターミクスを次の通り調製する: $8 \mu\text{l}$ の $10 \times$ キレート緩衝液; $6-10 \mu\text{l}$ の 25 mM MgCl_2 ; $1 \mu\text{l}$ のプライマー DM151 (SEQ ID No. 10) ($15 \mu\text{M}$) または実験的上流側プライマーならびに滅菌蒸留水。水、 MgCl_2 および上流側プライマーの体積の任意の組み合わせが、マスターミクスの全体積が試料あたり $80 \mu\text{l}$ である限り使用できる。

【0120】至適 MgCl_2 濃度は、全 dNTP 濃度、ならびに使用するプライマーおよびテンプレートに依存して変化する。ほとんどの場合において、反応混合物中の $1.5-2.5 \text{ mM}$ の範囲の MgCl_2 最終濃度は、良好な結果を与えるであろう。使用されるテンプレートが正の対照 pAW109 RNA である場合に、 $6 \mu\text{l}$ の 25 mM MgCl_2 、保存溶液が、最終 1.5 mM MgCl_2 濃度のために好ましい。

【0121】 $80 \mu\text{l}$ のPCRマスターミクスを各逆転写反応チューブ内に調合する。試料の持ち越しを避けるために添加の間にピペットチップを交換する。チューブをマイクロ遠心機にて ~ 30 秒間遠心する。

【0122】 pAW109 RNA 正対照の増幅のために、サーマルサイクラ ($\text{Perkin Elmer, Norwalk, CT}$) を次のように4つの結合ファイルについてプログラムした:

ステップサイクル: 95°C にて 2 分間を 1 サイクル

ステップサイクル: 95°C にて 1 分間および 60°C にて 1 分間を 35 サイクル

ステップサイクル: 60°C にて 7 分間を 1 サイクル

ソーク: 4°C

PCR増幅試料は、次の分析まで冷凍保存可能である。

【0123】アニール-伸長温度のための 60°C の選択は、正の対照 cDNA 増幅のために最適である。他のプライマー-テンプレート対については、アニール-伸長温度を低下または上昇させる必要があるであろう。より高いアニール-伸長温度は、一般に改善された生成物特異性を与えるであろう (ここに参考として取り入れるS

(20)

特開平7-59599

37

38

aikiらの、1988, Science 239:487-491参照)。至適条件は、最大の特異性および生成物の収率に達するまで5℃またはそれ以下の増加量毎に試験することによって経験的に決定することができる。

【0124】PCR増幅のための至適塩化マグネシウム濃度は、各プライマーの組について1.5から2.5mMまでの濃度を試験することによって、経験的に決定することができる。過少量のまたは過大量の塩化マグネシウムは、増幅効率に影響するであろう。塩化マグネシウム濃度を試料RNA、dNTP、cDNAおよびDNA濃度の実質的变化と並行して調整することが好ましい。

【0125】多量の2次構造を含むことが既知であるテンプレートについては、“ホットスタート”プロトコルが好ましいであろう。逆転写反応のために2種の反応

rTthDNAポリメラーゼ

プライマー-DM152 (SEQ ID No. 11) 15μM

プライマー-DM151 (SEQ ID No. 10) 15μM

正の対照RNA

5×10³ コピー/μl

dATP

10mM

dGTP

10mM

dCTP

10mM

dTTP

10mM

10×rTth逆転写RT緩衝液

100mMトリス-HCl

pH8.3, 900mMKCl

50%グリセロール (v/v)

100mMトリス-HCl,

pH8.3, 1MKCl

7.5mMEGTA,

0.5%Tween20

MnCl₂ 溶液

10mM

MgCl₂ 溶液

25mM

【0128】これらの成分は、高温逆転写用キットとして組み合わせられてもよい。該キットの変形は、開示される発明の範囲内である。例えば、MnCl₂は、逆転写反応緩衝液に含まれてもよく、またMgCl₂は、キレート緩衝液に含まれてもよい。しかしながら、反応の至適化のためには、MnCl₂およびMgCl₂は、別個の試薬として提供される。正の対照の使用は、必須ではないが発明の商業的態様として好ましい。

【0129】例3

均質RT/PCRアッセイ

この方法は、2工程単一添加逆転写/PCR増幅反応の方法を提供する。TC9600サーマルサイクラ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) を使用し、装置を起動し、反応混合物調製前にカバーを余熱した。反応を、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能な0.2ml Micro Amp (登録商標) チューブ内で行った。各反応物は、6.4μlの滅菌蒸留水; 2μlの10×RT緩衝液

混合物が調製される。ミクスA: 9.4μlの滅菌蒸留水; 2μlの10×rTth逆転写緩衝液; 1μlの“下流側プライマー”; 2μlの試料RNA (<250ngの全RNA)。ミクスB: 2μlの10mMMnCl₂ 溶液; 0.4μldGTP; 0.4μldATP; 0.4μldCTP; 0.4μldTTP (各々10mM); 2μlのrTthDNAポリメラーゼ。

【0126】両反応混合物を室温にて調製する。ミクスAを70℃にて6分間インキュベートし、反応ミクスBを添加し (ミクスAを70℃に保ったまま)、70℃にて5-15分間、上記“逆転写反応”の節に記載されるようにインキュベートする。上記のようにPCR反応を行う。

【0127】C. 試薬

好ましいプロトコルは、以下の試薬を使用する。

2.5単位/μl

15μM

15μM

5×10³ コピー/μl

10mM

10mM

10mM

10mM

100mMトリス-HCl

pH8.3, 900mMKCl

50%グリセロール (v/v)

100mMトリス-HCl,

pH8.3, 1MKCl

7.5mMEGTA,

0.5%Tween20

10mM

25mM

(100mMトリス-HCl, pH8.3, 900mMKCl); 1.6μlの10mMMnCl₂; 2μlの10×dNTP-T (H₂O pH7.0中、dATP、dCTP、dGTP各2mM); 2μlの2mMdTTP; 1μlのプライマー-DM152 (SEQ ID No. 11) (15μM); 1μlのプライマー-DM151 (15μM); および2μlのrTthDNAポリメラーゼ (2.5単位/μl) を含む。20×反応混合物を調製し (全体積360μl)、18μlの混合物を、下記テンプレートを含む16本のチューブに分取した。使用したテンプレートは、AW109cRNAである。チューブ番号1-3および9-11のそれぞれは、2μl中に10⁴ コピーのテンプレートを含んでいた。チューブ番号4-6および12-14のそれぞれは、2μl中に10³ コピーを含んでいた。チューブ番号7、8、15および16は、負の対照として2μlの30ng/μlrRNAのみを含んでいた。

【0130】チューブ番号1-8は、-RT対照として

(21)

特開平7-59599

39

40

RT反応の間氷上に維持した。チューブ番号9-16を、TC9600サーマルサイクラ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) に設置し、70℃にて15分間の1サイクルについて加熱し、次いで95℃に加熱し、この間にチューブ番号1-8をPCR工程のためにサーマルサイクラに設置した。すべてのチューブを以下のサイクルにかけた：

75秒間95℃にて1サイクル

30秒間95℃、20秒間60℃にて35サイクル

2分間60℃にて1サイクル

【0131】結果

次いで各反応物5μlを、2%NuSieve1%アガロースゲル上で分析し、エチジウムブロマイドにて染色し、写真を撮った。予想される大きさの生成物は、-RT対照(チューブ番号1-8)または“負の標的対照”(チューブ番号15および16)では見られなかった。予想される大きさの生成物は、レーン9-11(10⁴コピーの標的)では容易に見られ、また予想通りより低い強度ではあるがレーン12-14(10³コピーの標的)にも存在した。

【0132】例4

高温逆転写および増幅におけるPCR持ち越し防止としてのdUTPおよびウラシル-N-グリコシラーゼ(UNG)の使用

この例は、持ち越し夾雑を最小化するための非慣用ヌクレオチドの取り込みを例示する。反応混合物を、同じ非慣用ヌクレオチドを含む先行するアッセイからの夾雑生成物を分解するために、逆転写に先行してUNGにて処理した。UNG処理は次の通りである：20μlのRT反応あたり、0.5単位のUNG (Hoffmann-La Roche Inc. により開発製造され、PerkinElmer, Norwalk, CTから商業的に入手できる)。該反応物を室温にて10分間インキュベートし、次いで70℃にて15分間加熱してグリコシラーゼを不活性化し、逆転写を可能とした。該実験は、示された特定の標的、プライマー、および反応条件に対する至適濃度の決定のためのMnCl₂濃度の測定も例示する。cDNAは、次いでPCRにより増幅された。

【0133】8xRT反応混合物を、以下を含んで調製した：48μlの滅菌DEPC処理蒸留水；16μlの10xRT緩衝液(100mMトリス-HCl, pH 8.3；900mMKCl)；それぞれ2mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdUTPを含む16μlのdNTP混合物；16μlづつの、DM152 (SEQ ID No. 11) (1.5μM) およびDM151 (SEQ ID No. 10) (1.5μM)；16μlのAW109cRNAテンプレート(5x10³コピー/μl)；ならびに16μlのrTthDNAポリメラーゼ(2.5単位/μl)。最終体積は、144μlであった(18μl/反応)。7xPCRマスターミ

クスを、以下を含んで調製した：297μlの滅菌DEPC処理蒸留水；56μlの10xPCR緩衝液(100mMトリス-HCl, pH8.3；1MKCl；7.5mMEGTA；50%グリセロール[v/v])；140μlの10mMMgCl₂；それぞれ2mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdUTPを含む56μlのdNTP混合物；それぞれ5.6μlづつの、DM152およびDM151 (SEQ ID No. 11および10) (15μM)。最終体積は660μlであった。反応あたり80μl。

【0134】18μlのRT混合物を6本の滅菌マイクロ遠心チューブに分け、2μlのMnCl₂を、次の最終MnCl₂濃度となるように添加した：チューブ番号1および2(1.2mMのMnCl₂)；チューブ番号3および4(1.0mMのMnCl₂)；チューブ番号5および6(0.8mMのMnCl₂)。各チューブに鉱油のオーバーレイ(75μl)を加え、該反応物を水浴中で70℃にて15分間インキュベートした。70℃でのインキュベーションに次いで、それぞれに80μlのPCRマスターミクスを添加した。反応チューブを次の熱サイクルにかけた：95℃にて2分間を1サイクル；95℃にて1分間および60℃にて1分間を35サイクル；60℃にて7分間を1サイクル；および4℃に浸す。

【0135】結果

各反応混合物の5μlを2%NuSieve1%アガロースゲル上で電気泳動にかけた。ゲルを染色し、写真を撮った。予想される大きさのPCR生成物が、3種すべてのMnCl₂濃度の試料にて明確に見られた。生成物の収率は、MnCl₂濃度の上昇と共に増大した。

【0136】例5

均質RT/PCRアッセイの滅菌方法

この例は、先行する反応において生じた核酸により夾雑する均質RT/PCR反応物の滅菌方法を例示する。反応混合物は、逆転写の前にUNGにて処理された。

【0137】非慣用ヌクレオチドdUTPをRT/PCR反応の間に取り込んだ。続いて、引き続き反応物中に夾雑物として存在するいずれの生成物DNAも、UNGを使用して加水分解されうる。

【0138】0.2mlのMicroAmp(登録商標)チューブに、5.5μlの滅菌蒸留水；2μlの10xRT緩衝液(100mMトリス-HCl, pH 8.3；900mMKCl)；2μlの8mMMnCl₂；dATP、dCTP、dGTP、およびdUTPをそれぞれ2mM含む2μlのdNTP混合物；2μlのDM152 (SEQ ID No. 11) (1.5μM) およびDM151 (SEQ ID No. 10) (1.5μM)；2μlのAW109cRNAテンプレート(5x10³コピー/μl)；0.5μlのUNG(1単位/μl)；および2μlのrTth(2.5単

(22)

特開平7-59599

41

位/ μ l)を合わせた。該反応物を室温にて10分間インキュベートし、次いで70℃にて15分間加熱して、逆転写に先立ってグリコシラーゼを不活性化した。次いでcDNAをPCRにて増幅した。

【0139】この例において、正の対照RNAは、DM152 (SEQ ID No. 11) のためのテンプレートとして作用し、またDM151 (SEQ ID No. 10) は上流側プライマーである。全反応体積は、20 μ l/試料である。チューブをサーマルサイクラ (例えばTC9600サーマルサイクラ [Perkin Elmer, Norwalk, CT]) にて以下のよう

にインキュベートした:

70℃にて15分間を1サイクル

95℃にて15秒間および60℃にて20秒間を2サイ

クル

90℃にて15秒間および60℃にて20秒間を33サ

イクル

60℃にて4分間を1サイクル

至適マンガン濃度は、特定の試料、標的、プライマー、反応混合物中のdNTP濃度等に依存して変化する。20

【0140】例6

付加的テンプレート核酸

付加的RNAおよびDNAテンプレートを使用する実験を、以下の例に記述する。

1. pTM3

プラスミドpTM3は、約700ヌクレオチドのpAW109 DNAを伴う7821番番を地産の環状単鎖DNAである。これは、pAW109 cRNAと同じ配列およびプライマー結合部位を有するDNAテンプレートを与える。プライマーMT24 (SEQ ID No. 30 13) を使用して転写すると、最初の253ヌクレオチ

オリゴ SEQ ID No.

MT24	13	5'-CAGGTCCTCCCAAGTCTGGCGCCCTGCAAATGAGACACTTCTCG-3'
MT20	14	5'-GATCTCCGGACTCTAGA-3'
MT21	15	5'-AATTCTAGAGTCCGGA-3'

配列

【0144】II. HCV

HCV RNA転写物は、ここに参考として取り入れるYoungら、1993, J. Clin. Microbiol. 31: 882-886に記述されているようにして作成された。cDNAクローンは、それにおいてpHCV1.1Aと命名されている。HCVテンプレートの増幅に好適なプライマーは、KY78 (SEQ ID No. 16: 5'-CTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT-3') およびKY90 (SEQ ID No. 17: 5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT-3') である。KY78 (SEQ ID No. 16) およびKY90 (SEQ ID No. 17) は、5'末端がビオチン化されており、またKY80 (SEQ ID No. 17) はKY90

42

Dは、pAW109 cRNAと同じである。その領域を越えると、DNAはG+Cリッチになり、Taq DNAポリメラーゼの遺伝子を含むThermus aquaticus由来のDNAを含有する。pTM3プラスミドは、この分野で周知の技術を使用する以下のプロトコルを用いて構築された (ここに参考として取り入れるSambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。

【0141】挿入物を、上述のpAW109 DNAをBamHIにて線状化することにより調製した。リンカーアダプタMT20 (SEQ ID No. 14) およびMT21 (SEQ ID No. 15) を、線形化pAW109 DNAにアニール化し、連結した。これらのリンカーは、BamHI部位にアニール化する。該断片を、EcoRIにて消化し、得られた706bp断片をゲルにて精製した。

【0142】発現ベクトルpLSG1は、ここに参考として取り入れる米国特許4,889,818に記述されており、Taq DNAポリメラーゼをコードする遺伝子を含んでいる。該プラスミドpLSG1をEcoRIを用いて線状とし、過剰量のゲル精製した断片と混合し、該断片に連結した。得られたプラスミドにてDG98を形質転換し、ヘルパーファージを用いて単鎖DNAを単離した (米国特許4,889,818および5,079,352ならびにLawyerら、1993の前出文献に記述されている)。

【0143】上記反応において使用されたオリゴヌクレオチド配列は、下記に示される:

(SEQ ID No. 17) のビオチン化されない形態である。

【0145】III. HIV

テンプレートはHIV-1と同じプライマー結合領域を有して設計され、またプライマー結合部位が両端に位置する内部領域は、同じ塩基組成を保ちながら、対応するHIV-1配列とは固有の配列特異性のプロンプトにて検出可能とするに充分に異なるヌクレオチド配列をもって設計される。HIVテンプレート増幅のために好適なプライマーは、前述のSK431 (SEQ ID No. 6) およびSK462 (SEQ ID No. 5) のビオチン化誘導体である。

【0146】テンプレートは、3'末端の相補部分の8塩基が重複する2個のオリゴヌクレオチドのアニール化

および伸長によって作成した。構成するオリゴヌクレオチドは、上述のオリゴヌクレオチドのいずれの合成方法によっても合成される。第1のオリゴヌクレオチドSK550 (SEQ ID No. 18) は、Sal I リンカーおよびSK462 (SEQ ID No. 5) のプライマー結合領域を含む。第2のオリゴヌクレオチドSK551 (SEQ ID No. 19) は、SK431 (SEQ ID No. 6) のプライマー結合領域を含む。対照テンプレートの合成は、この分野で周知の方法を使用して行われる (Sambrookら、1989 10 の前出文献)。

【0147】アニール化および伸長反応のための反応混合物は、次の通りである：

7 μ l の10xポリメラーゼ緩衝溶液 (100mMのトリス-HCl、pH7.5、500mMの塩化ナトリウム (NaCl)、100mMの酢酸マグネシウム [Mg (OAc)₂])

50 pmole のSK550 (SEQ ID No. 18)

50 pmole のSK551 (SEQ ID No. 19)

それぞれ15 μ l のdATP、dGTP、dCTP、d

オリゴ
SK550

SEQ ID No.
18

SK551

19

配列
5'-CGCGTCGACAGTTGGAGGACATC
AAGCAGCCATGCAAATGTTAAACATAGC
ACTATAGAACTCTGCAAGCCTGAGTG-3'
5'-GATCCTGCTATGTCAAGTCCCTTGGT
TCTCTCATCTGGCCTGGTCAAT
AGGCCCTGCATGCACTGGCACTCTCACT
CGAG-3'

【0151】例7 マンガン濃度範囲

ピシンまたはトリス緩衝溶液のいずれかにおいてRNAおよびDNAテンプレートを使用する伸長反応を、各反応における使用可能なMn²⁺濃度範囲を決定するために行った。DNAテンプレートを用いた伸長反応、およびRNAテンプレートを用いた伸長反応のための一連のMn²⁺濃度を使用した。すべての反応を、全体積20 μ l 中において、60℃にて10分間行った。反応条件は以下の通りである：

【0152】RNAテンプレート、ピシン緩衝溶液

3 x 10¹¹ コピーのpAW109cRNA
0.125 μ MのMT24 (SEQ ID No. 13)

各300 μ MのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

50mMのピシン-KOH (pH8.3)

100mMのKOAc (pH7.5)

Mn (OAc)₂ (示される1-20mM、1-6mM)

TTP (10mMの保存溶液)

1 μ l のクレナウ断片 (5U)

70 μ l までH₂O

【0148】2種のオリゴヌクレオチドを混合し、氷上に10分間保持して各オリゴヌクレオチドの3'末端をアニール化させた。伸長反応を室温にて30分間、次いで37℃にて10分間行わせた。伸長に続いて、反応混合物を72℃に10分間維持してポリメラーゼを不活性化した。伸長生成物を二重配列のSK550 (SEQ ID No. 18) 末端を切断するSal Iにて消化し、またSK551 (SEQ ID No. 19) 末端は平滑のままとした。得られた断片を、転写ベクトルpSP64 (Promega, Madison, WI) (ポリAを伴う) のSal IおよびSma I部位にクローン化し、プラスミドpNAS-2を生じた。

【0149】単離および精製に続いて、pNAS-2をEcoRIによる消化にて線状化し、SP6RNAポリメラーゼを用いてインビトロにて転写した。残渣DNAを除去するために、RNAをRNase非含有DNaseにて消化し、オリゴ-dTカラムを通した。

【0150】上記反応にて使用したヌクレオチド配列は、下記に示される：

5UのrTth⁺ DNAポリメラーゼ RNAテンプレート、トリス緩衝溶液

3 x 10¹¹ コピーのpAW109cRNA

0.125 μ MのMT24 (SEQ ID No. 13)

各200 μ MのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

10mMのトリス-HCl (pH8.3)

90mMのKCl

40 MnCl₂ (0.4-2.5mM)

5UのrTth⁺ DNAポリメラーゼ

【0153】DNAテンプレート、ピシン緩衝溶液

1.5 x 10¹¹ コピーのpTM3ssDNA

0.0625 μ MのMT24 (SEQ ID No. 13)

各300 μ MのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

50mMのピシン-KOH (pH8.3)

100mMのKOAc (pH7.5)

50 Mn (OAc)₂ (1-5mM)

(24)

特開平7-59599

45

0.15UのrTth^{*} DNAポリメラーゼ
DNAテンプレート、トリス緩衝溶液
 1.5 × 10³ コピーのpTM3ssDNA
 0.0625 μMのMT24 (SEQ ID No. 13)
 各200 μMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP
 10mMのトリス-HCl (pH8.3)
 90mMのKCl
 MnCl₂ (0.4-2.5mM)

テンプレート緩衝剤

RNA

ピシン

RNA

トリス

DNA

ピシン

DNA

トリス

【0155】トリス緩衝溶液を使用して、DNAテンプレートにより至適合成を与えるマンガン濃度は、約0.6mMであることが見いだされ、またRNAテンプレートを用いて約1.4mMのマンガンを、酵素が最大逆転写活性を持つことが見いだされた。ピシン緩衝溶液を置換すると、各反応についての至適Mn²⁺濃度は、増加し、かつ拡大された。ピシン緩衝溶液を使用して、DNAテンプレートでの最大合成は、1.5mMマンガンに移行し、RNAテンプレートでの合成量の増大は6mMマンガンまで見られた。rTth DNAポリメラーゼのRNAテンプレートに対する逆転写酵素活性およびDNAテンプレートに対するDNAポリメラーゼ活性について、Mn²⁺の至適条件は、ピシン緩衝溶液を使用した場合にそれぞれの反応によって異なるが、均質RT/PCRについて約3.2mMの単一Mn²⁺濃度は、少なくとも上記例3に記載のトリス緩衝溶液を使用するRT/PCR条件と同程度に有効であると思われる。しかしながら、各反応の使用可能なマンガン濃度範囲は、かなり拡大される。このことは、金属緩衝剤の一般論および文献からは二面的範囲の拡大を予想することは出来ず、驚くべき結果である。

【0156】例8

HIVテンプレート、トリシンおよびピシン緩衝溶液を使用するRT/PCR

一連のMnCl₂濃度の力価測定を、トリシンおよびピシン緩衝溶液の両者においてHIVテンプレートを用い、RT/PCRにて使用した。反応は、基本的には下記例10に記載されているようにして100 μlの全反応体積にて行った。特定の反応条件は下記の通りである：

200 コピーのHIVcRNA (pNAS-2)

1 μg のポリ rA

13%グリセロール

各150 μMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP

46

5UのrTth^{*} DNAポリメラーゼ

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0164】取り込まれたdNMPを、ここに参考として取り入れる前出のMyersおよびGelfand、1991に記載されているようにアッセイした。結果を図1に示す。取り込まれたdNMPの量は、各反応の最大取り込み量の百分率として表されている。各反応についての最大取り込み量は以下の通りである：

100%活性

88 pmolのdNMP取り込み

87 pmolのdNMP取り込み

188 pmolのdNMP取り込み

173 pmolのdNMP取り込み

P

200 μMのdUTP

各0.20 μMのSK431 (SEQ ID No. 6)、SK462 (SEQ ID No. 5)

2単位のUNG^{*}

10単位のrTth^{*} DNAポリメラーゼ

65mMのKCl

50mMのトリシン-KOH (pH8.3) またはピシン-KOH (pH8.3)

MnCl₂ (1.0、1.2、1.5、1.75、2.0、2.5mM)

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0157】HIV RNA標的中のアデニンの高い割合、および逆転写に際してTth DNAポリメラーゼがdUTPを取り込むことによる効率低下のために、反応緩衝溶液は200 μMのdUTPに加えて150 μMのdTTPを含む。熱サイクルの様式は、逆転写工程を70℃にて15分間行ったことを除いて、例10に記載のものと基本的に同じであった。増幅生成物は、例10に記載のように、ゲル電気泳動にて分析された。標的は、ピシンおよびトリシンの両緩衝溶液において、1.0-2.5mMのMn²⁺濃度範囲で逆転写され、増幅されることが見いだされ、また1.2-2.0mMのMn²⁺濃度範囲でより高水準の生成物形成が見られた。

【0158】例9

増大したdNTP耐性

ピシン/KOAc/Mn(OAc)₂緩衝溶液を使用して、dNTP濃度耐性の増大を評価するために、HCVcRNA標的 (pHCV1.1A) のRT/PCR増幅を、ピシンおよびトリシン緩衝溶液を使用し、異なるdNTP濃度にて行った。反応をここに記述する修飾を除いて基本的に下記例10に記載されるように行った

(25)

特開平7-59599

47

【0159】HCV cRNA標的は、前述の例6に記載されている。反応は、以下の条件の元で100 μ lの体積で行われた:

300コピーのHCV cRNA

KY78 (SEQ ID No. 16)、KY78 (SEQ ID No. 16) のそれぞれを0.15 μ M
1 μ gのポリrA

8%のグリセロール

10単位のrTth^{*} DNAポリメラーゼ

2単位のUNG^{*}

dATP、dCTP、dGTP、dTTP (各100 μ M-500 μ M)

50mMのピシン-KOH (pH8.3) またはトリス-HCl (pH8.3)

100mMのKOAc (pH7.5) または90mMのKCl

2.5mMのMn (OAc)、または0.9mMのMnCl₂

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0160】熱サイクルのパラメータは、逆転写を70℃にて25分間行い、また40回の増幅サイクルを行ったことを除いて、下記例10に記載のものと基本的に同様である。増幅生成物は、例10に記載されるようにゲル電気泳動により分析された。結果を図2に示す。ピシン/KOAc/Mn (OAc)、緩衝溶液を使用しての増幅生成物の形成は各dNTPの100-500 μ MのdNTP濃度範囲に亘って観察された。対照的に、トリス/KCl/MnCl₂、緩衝溶液を使用すると200 μ Mの各dNTP濃度においてのみ、有意な水準の増幅生成物が形成された。

【0161】例10

HIVテンプレート用

15%グリセロール (w/v)

300 μ M dATP

300 μ M dCTP

300 μ M dGTP

50 μ M dTTP

500 μ M dUTP

20 pmol / rxn

上流プライマー

20 pmol / rxn

下流プライマー

2単位のUNG^{*}

48

HCVおよびHIVテンプレートを使用する均質RT/PCR

C型肝炎ウイルス (HCV) 検出のためのRT/PCR増幅に基づくアッセイは、ここに参考として取り入れるヨーロッパ特許出願EP-A-529,493およびYoungら、1993の前出文献に記載されている。EP-A-529,493は、マイクロエルプレート検出様式を使用する増幅生成物の検出を記述している。同様なアッセイは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の検出にも有用である。本発明の均質RT/PCR法は、下記のプロトコールを使用してHIVおよびHCVウイルステンプレートを増幅するために有用である。ピシン/KOAc/Mn (OAc)、およびトリス/KCl/MnCl₂、緩衝溶液の両者を使用した均質反応が、以下に記述される: ピシン/KOAc/Mn (OAc)、緩衝溶液の使用が好ましい。試料テンプレートは、臨床的試料または例6に記載されるHIVおよびHCVテンプレートのいずれであってもよい。臨床的試料の調製のために好適な方法は、上記に引用したHCVアッセイの参考文献に記載されている。

【0162】HIVテンプレートのRT/PCR増幅のために好ましいプライマーは、SK431 (SEQ ID No. 6) およびSK462 (SEQ ID No. 5) のデオキシ化誘導体である。HCVテンプレートのRT/PCR増幅のために好ましいプライマーは、KY78 (SEQ ID No. 16) およびKY90 (SEQ ID No. 17) である。

【0163】ピシン-KOH (pH8.3)、KOAc (pH7.5) およびMn (OAc)、を100 μ l全反応体積にて使用するHIVおよびHCV RT/PCRのための反応条件は、以下の通りである。HIV反応条件は、dUMPの取り込みを促進するための増大したdUTP濃度の使用を例示している。

HCVテンプレート用

10%グリセロール (w/v)

200 μ M dATP

200 μ M dCTP

200 μ M dGTP

200 μ M dUTP

15 pmol / rxn

上流プライマー

15 pmol / rxn

下流プライマー

2単位のUNG^{*}

(26)

特開平7-59599

49

50

10単位のrTth^{*}DNA10単位のrTth^{*}DNA

ポリメラーゼ

ポリメラーゼ

50mMピシン-KOH pH, 8.3

50mMピシン-KOH pH, 8.3

100mMKOAc pH7.5

100mMKOAc pH7.5

3.6mMMn(OAc),

3.5mMMn(OAc),

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、
Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0164】全反応体積100 μ l中のトリス-HCl
(pH8.3)、KCl、MnCl₂のための反応条

件:

HIVテンプレート用HCVテンプレート用

15%グリセロール(w/v)

10%グリセロール(w/v)

150 μ MdATP200 μ MdATP150 μ MdCTP200 μ MdCTP150 μ MdGTP200 μ MdGTP150 μ MdTTP200 μ MdUTP

20pmol/rxn

15pmol/rxn

上流プライマー

上流プライマー

20pmol/rxn

15pmol/rxn

下流プライマー

下流プライマー

2単位のUNG^{*}2単位のUNG^{*}10単位のrTth^{*}DNA10単位のrTth^{*}DNA

ポリメラーゼ

ポリメラーゼ

90mMKCl

90mMKCl

10mMトリス-HCl pH, 8.3

10mMトリス-HCl pH, 8.3

0.85mMMnCl₂,0.90mMMnCl₂,

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、
Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0165】反応は、TC9600サーマルサイクラ
(Perkin Elmer, Norwalk, CT)
にて行われた。該サーマルサイクラは、HIVテンプレ
ートの増幅のために以下の温度様式を与えるようにプロ
グラムされた: UNG滅菌のために50℃にて2分間;
逆転写工程のために60℃にて30分間; (95℃にて
10秒間、55℃にて10秒間、72℃にて10秒間)
を4サイクル; 24サイクル(マイクロウェルプレート
アッセイ)、または36サイクル(アガロースゲルアッ

セイ)の(90℃にて10秒間、60℃にて10秒間、
72℃にて10秒間); ならびに72℃にて保持。

【0166】該サーマルサイクラは、HCVテンプレ
ートの増幅のために以下の温度様式を与えるようにプロ
グラムされた: UNG滅菌のために50℃にて2分間; 逆
転写工程のために60℃にて30分間; 2サイクルの、
95℃にて15秒間、60℃にて20秒間; 38サイク
ルの、90℃にて15秒間、60℃にて20秒間; 60
℃にて4分間; ならびに72℃にて保持。

(27)

特開平7-59599

51

52

【0167】増幅生成物は、アガロースゲル電気泳動に続く可視化、またはマイクロエルプレートアッセイのいずれかにより分析された。アガロースゲル分析のために、5 μ lの各反応物を、2 μ lの負荷緩衝溶液(30% γ -グリセリン、0.1%プロモフェノールブルー、10mM EDTA)に添加し、エチジウムブロマイド(100mMのアガロースあたり10 μ g)をアガロースに添加した1xトリス-ボレートEDTA中での4% (3%Nu Sieve、1%アガロース)アガロースゲル電気泳動により分析した。電気泳動は、125Vにて30分間で

【0168】HCVのマイクロエルプレート分析は、EP-A-529,493および一般的に米国特許5,232,829に記述されている。HIV増幅生成物のマイクロエルプレート分析は、HCVについて記述されると同様であるが、ここに参考として取り入れるJacksonらの、1991, AIDS 5:1463-1467に記述されているHIV特異的プローブを使用する。

【0169】例11

RNA安定性

異なる緩衝条件を使用してRNAの安定性をアッセイす

添加試薬

1. 無添加(4℃のインキュベーション)

るために、逆転写反応のものと同様であるが合成が起こらないようにポリメラーゼを除いた反応混合物中で、昇温下にてインキュベートした。反応混合物(各20 μ lの体積)は次を含んでいた:

100ng [³²P] 標識pAW109cRNA

1.5 μ MKY80 (SEQ ID No. 17)

各200 μ MのdATP、dCTP、dGTP、およびdUTP

2 μ lのrTthDNAポリメラーゼ保存用緩衝溶液(5単位のポリメラーゼに相当)

【0170】緩衝条件は、下記緩衝剤を上記試薬に添加することによって変化させた。すべての反応物を、比較のために4℃にて25分間インキュベートした試料1を除いて、70℃にて25分間インキュベートした。回収された完全長RNAの量は、ゲル電気泳動に続く、Ambis 4000放射分析造影装置(Ambis, Inc., San Diego, CA)を使用して測定した。すべての値は、試料2の結果を100%として正規化してある。ピシン-KOHおよびトリス-HClはpH8.3にて添加され;KOAcはpH7.5である。

【0171】

回収量

113%

(28)

特開平7-59599

2. 無添加 (70℃のインキュベーション)	100%
3. 2.5mMMn(OAc);	6%
4. 2.5mMMn(OAc); ; 100mMKOAc	1%
5. 2.5mMMn(OAc); ; 50mMピシン-KOH	3%
6. 2.5mMMn(OAc); ; 100mMKOAc; 50mMピシン-KOH	25%
7. *2.0mMMn(OAc); ; 100mMKOAc; 50mMピシン-KOH	47%
8. 2.5mMMn(OAc); ; 100mMKOAc; 50mMピシン-KOH	29%
9. 3.0mMMn(OAc); ; 100mMKOAc; 50mMピシン-KOH	25%
10. 0.9mMMnCl;	40%
11. 1.0mMMnCl;	36%
12. 0.9mMMnCl; ; 9.0mMKCl; 10mMトリス-HCl	16%

* 試料7は更に100μMの各dNPT (300μMの各dNPT)を含む。

【0172】RNAの加水分解に触媒作用するマンガンの添加は、試料2および3を比較して分かるように高温にてRNAの分解を増大する。2.5mMMn(OAc); ; 100mMKOAc; 50mMピシン-KOHを含む緩衝溶液の添加は、RNA分解をかなり低減する。試料3、4、5および6の比較は、観察されるRNA分解量を低減するためには、緩衝溶液のすべての成分が存在しなければならないことを示している。試料6-9を試料12と比べて分かるように、MMn(OAc); /KOAc/ピシン-KOH緩衝溶液は、MnCl; /KCl/トリス-HCl緩衝溶液よりもRNA分解量を低減した。

【0173】高温でのブレインキュベーションは、逆転写に先立ってRNAを変性することにより、高度の2次構造を有する標的に加えて二重鎖RNA標的の増幅を容易にするであろう。MMn(OAc); /KOAc/ピシン-KOH緩衝溶液におけるRNAの安定性に対する高温ブレインキュベーションの効果を評価するために、RNAを逆転写反応のものと同様であるが合成が起こらないようにポリメラーゼを除いた反応混合物中で、昇温下にてインキュベートした。反応混合物 (各20μlの

体積)は次を含んでいた:

250ng [³²P] 標識pAW109cRNA
1.5μMDM161 (SEQ ID No. 10)
各300μMのdATP、dCTP、dGTP、およびdUTP
50mMのピシン-KOH (pH8.3)
100mMKOAc (pH7.5)
2.5mMMn(OAc);
2μlのrTthDNAポリメラーゼ保存用緩衝溶液
(5単位のポリメラーゼに相当)

【0174】反応混合物を、下記の温度にてインキュベートし、完全長RNAの最終量を、ゲル電気泳動に続く、Ambis4000放射分析造形装置 (Ambis, Inc., San Diego, CA) を使用して測定した。インキュベーションを3個一組で行い、残留する未分解RNAの平均量を4℃、25分間のインキュベーション後に残留した量に対して正規化してある。1群の3個の反応インキュベーションから回収される量の平均標準偏差は、11%であった。

【0175】

(29)

特開平7-59599

55

インキュベーション温度

4℃にて25分間
85℃にて15秒間、4℃にて25分間
60℃にて25分間
95℃にて15秒間、60℃にて25分間

56

増幅量

100%
84%
86%
88%

【0176】60℃にて25分間のインキュベーションは、前述の例に記載した逆転写の条件と対比できる。RNAの15秒間、95℃のブレインキュベーションを含んだ場合には、完全長標識RNAの検出可能な更なる損失はなかった。

【0177】例12HCVテンプレートを使用するRT/PCRにたいするマンガン濃度の効果

RT/PCR反応を、ピシン/KOAc/Mn(OAc)、およびトリス/KCl/MnCl₂、緩衝溶液の両者を使用してマンガン濃度の範囲に亘って行った。100μlの全反応体積におけるHCVRT/PCRの反応条件は下記の通りである。

100コピーのHCVcRNA
200μMのdATP
200μMのdCTP
200μMのdGTP
200μMのdTTP
15pmol/rxnのKY78 (SEQ ID N o. 16)
15pmol/rxnのKY90 (SEQ ID N o. 17)
2単位のUNG*
10単位のrTth* DNAポリメラーゼ
8%のグリセロール
50mMのピシン-KOH (pH8.3) または10mMのトリス-HCl (pH8.3)
100mMのKOAc (pH7.5) または90mMのKCl
Mn(OAc)、またはMnCl₂。

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0178】使用したマンガン濃度は、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5および4.0mMのMn(OAc)、および0.7、0.8、0.85、0.9、0.95および1.0mMのMnCl₂であった。反応はTC9600サーマルサイクラ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) にて行われた。該サーマルサイクラは、逆転写を70℃にて25分間行い、次いで95℃にて1分間インキュベートすることを除いて例10に記載されている温度様式でプログラムされた。増幅生成物は、例10に記載されているのと同様にアガロースゲル電気泳動に続いて可視化することによ

って分析された。

【0179】増幅生成物は、ピシン/KOAc/Mn(OAc)、緩衝溶液を使用してMn(OAc)、濃度の2.0-4.0mMの範囲で観察された。また、増幅生成物は、トリス/KCl/MnCl₂、緩衝溶液を使用してMnCl₂、濃度の0.8-1.0mMの範囲で観察された。これらの反応条件で、ピシン/KOAc/Mn(OAc)、緩衝溶液を使用した場合には、トリス/KCl/MnCl₂、緩衝溶液の場合に比べて10倍以上のマンガン濃度範囲に亘って観察された。

【0180】例13高いトリス濃度を使用するRT/PCR

RT/PCR増幅反応を、2種類のトリス濃度をもったトリス/KCl/MnCl₂、緩衝溶液を使用してマンガン濃度範囲に亘って行った。100μlの全反応体積におけるHCVRT/PCRの反応条件は下記の通りである。

500コピーのHCVcRNA
200μMのdATP
200μMのdCTP
200μMのdGTP
200μMのdTTP
15pmol/rxnのKY78 (SEQ ID N o. 16)
15pmol/rxnのKY90 (SEQ ID N o. 17)
2単位のUNG*
10単位のrTth* DNAポリメラーゼ
8%のグリセロール
10mMのトリス-KCl (pH8.3) または100mMのトリス-HCl (pH8.3)
90mMのKClまたは45mMのKCl
MnCl₂。

* Hoffmann-La Roche Inc. により開発および製造され、Perkin Elmer, Norwalk, CTから商業的に入手可能である。

【0181】使用したマンガン濃度は、各トリス濃度について0.7、0.8、1.0、1.2および1.3mMのMnCl₂であった。反応はTC9600サーマルサイクラ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) にて行われた。該サーマルサイクラは、逆転写を70℃にて25分間行い、次いで95℃にて1分間インキュベートを行うことを除いて例10に記載されている温度様式でプログラムされた。増幅生成物は、例1

(30)

特開平7-59599

57

58

0に記載されているのと同様にアガロースゲル電気泳動に続いて可視化することによって分析された。

【0182】増幅生成物は、100mMのトリス緩衝液を使用した場合にMnCl₂濃度の0.7-1.2mMの範囲で観察された。また、増幅生成物は、10mMのトリス緩衝液を使用した場合にMnCl₂濃度の0.8-1.0mMの範囲で観察された。これらの反応条件で、生成物はトリス/KCl/MnCl₂緩衝液中のトリス濃度が10mMから100mMに増大した場合により広いマンガン濃度範囲に亘って観察された。 10

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 1

GGCATATGGC TAGACTATTT CTTTTTG

27

【0185】

配列番号：2

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 2

AGGTTCCGAT GAAGTCTGTA GGTGATGTCT G

31

【0186】

配列番号：3

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 3

CTACAGACTT CATCGGAACC TCCTTAAGCG

30

【0187】

配列番号：4

配列の長さ：23塩基対

【0183】本発明を詳細に記述したが、変更および修飾を、特許請求の範囲の精神および範囲内で行うことが出来ることは理解されるであろう

【0184】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：27塩基対

配列の型：核酸

(31)

特開平7-59599

60

59

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 4

CCAACCCGCC TCGGCCACGA AGG

23

【0188】

配列番号：5

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 5

AGTTGGAGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT

30

【0189】

配列番号：6

配列の長さ：27塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 6

TGCTATGTCA GTTCCCCTTG GTTCTCT

27

【0190】

配列番号：7

配列の長さ：28塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 7

ATAATCCACC TATCCCAGTA GGAGAAAT

28

(32)

特開平7-59599

61

62

【0191】

配列番号：8

配列の長さ：29塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 8

TTTGGTCCTT GTCTTATGTC CAGAATGC

29

【0192】

配列番号：9

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 9

TGGAGAACAC CACTTGTTGC TCCA

24

【0193】

配列番号：10

配列の長さ：26塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：SEQ ID No. 10

GTCTCTGAAT CAGAAATCCT TCTATC

26

【0194】

(33)

特開平7-59599

64

63

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 2 5 塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 : SEQ ID No. 11

CATGTCAAAT TTCACTGCTT CATCC

25

[0195]

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 3 7 塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 : SEQ ID No. 12

GCTTGCAAGC TTTATTTAGT TATGACTGAT AACACTC

37

[0196]

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 4 4 塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 : SEQ ID No. 13

CAGGTCTCCC AAGTCTGGCG CCCTGCAAAT GAGACACTTT CTCG

44

[0197]

(34)

特開平7-59599

66

65

配列番号 : 14

配列の長さ : 17 塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 : SEQ ID No. 14

GATCTCCGGA CTCTAGA

17

[0198]

配列番号 : 15

配列の長さ : 17 塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 : SEQ ID No. 15

AATTCTAGA GTCCGGA

17

[0199]

配列番号 : 16

配列の長さ : 25 塩基対

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 : SEQ ID No. 16

CTCGCAAGCA CCCTATCAGG CAGT

25

[0200]

(35)

特開平7-59599

67

68

配列番号: 17

配列の長さ: 24塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列: SEQ ID No. 17

GCAGAAAGCG TCTAGCCATG GCGT

[0201]

配列番号: 18

配列の長さ: 79塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列: SEQ ID No. 18

CGCGTCGACA GTTGGAGGAC ATCAAGCAGC CATGCAAATG TTAAACATA GCACTATAGA 60
ACTCTGCAAG CCTCGAGTG 79

[0202]

配列番号: 19

配列の長さ: 85塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列: SEQ ID No. 19

GATCCTGCTA TGTCAGT7CC CCTTGGTTCT CTCATCTGGC CTGGTGCAAT AGGCCCTGCA 80
TGCACTGGAT GCACTCTCAC TCGAG 85

【図面の簡単な説明】

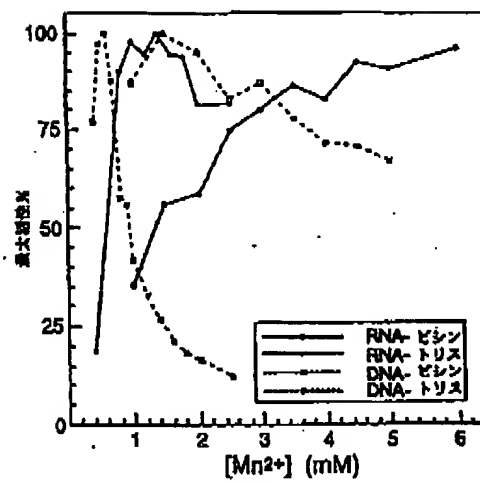
【図1】 図1は、例7に記述される伸長反応の結果を表すものであって、異なる緩衝溶液条件を使用するマンガンの濃度の範囲に亘って反応効率をアッセイした結果のグラフである。

【図2】 図2は、クロマトグラフを示す写真であって、例9に記述されるRT/PCRの結果を示す図であり、dNTP濃度の使用可能な範囲について、異なる緩衝溶液条件を使用してアッセイした電気泳動パターンである。

(36)

特開平7-59599

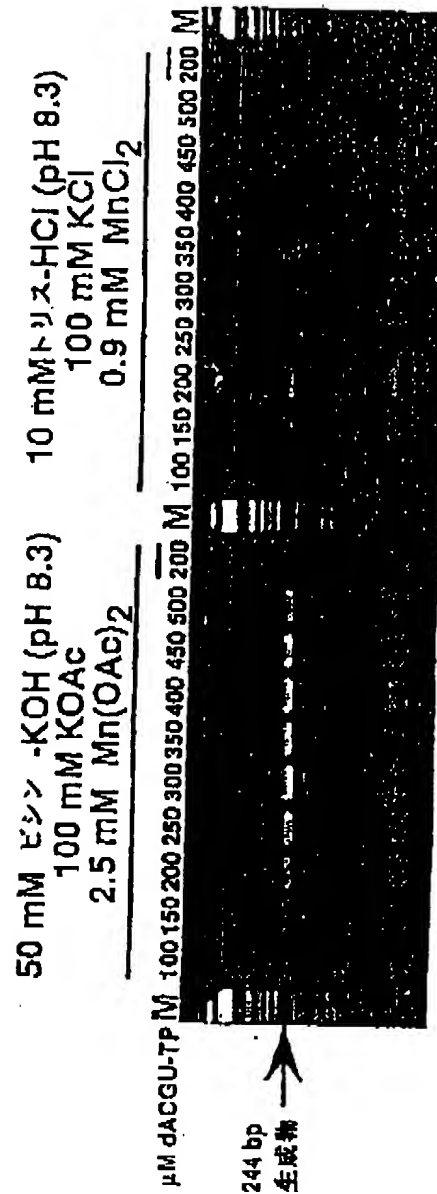
【図1】



(37)

特開平7-59599

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 トーマス ダブリュ. マイヤーズ
アメリカ合衆国カリフォルニア州アラメ
ダ, ファーンサイド プールバード 2910

(72)発明者 クリストファー, エル. シギユア
アメリカ合衆国カリフォルニア州アンティ
オック, プライドル コート 4825

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.